

Aus der Abteilung für Chirurgie und Chirurgische Onkologie der Robert-Rössle-Klinik
der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

DISSERTATION

Immunhistochemische Vergleichsanalyse von Primärzellaggregaten und Ursprungsgeweben unterschiedlicher Dignität zur Charakterisierung der in-vitro Anpassung

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor medicinis

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

von
Andreas String
aus Halle/ Saale

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. R. Felix

Gutachter: 1. Professor P. Hohenberger
 2. Professor St. Hauptmann
 3. Professor U. Gross

Datum der Promotion: 19. April 2002

Immunhistochemische Vergleichsanalyse von Primärzellaggregaten und Ursprungsgeweben unterschiedlicher Dignität zur Charakterisierung der in-vitro Anpassung

Zielsetzung: Dreidimensionale Zellkulturen stellen eine Weiterentwicklung der einschichtigen Zellkultur dar, die den in-vitro Bedingungen im Organismus näherkommt. Darüber hinaus ermöglichen organoide Kulturen, die neben der vorherrschenden Tumorzelle auch Bindegewebszellen und Immunzellen enthalten, eine Analyse der Interaktion dieser Zellen bei wichtigen Aspekten der Krebserkrankung wie Metastasierung, Angiogenese oder der Tumorimmunologie.

Materialien und Methoden: Operationsresektate von Schilddrüsengeweben, -adenomen und -karzinomen, Ovarialkarzinomen und Sarkomen wurden in Einzelzellsuspensionen überführt. Nach Inkubation im Schüttler wurden innerhalb von 24-48 Stunden Primärzellaggregate gezüchtet, von denen Kryostatschnitte angefertigt wurden. Mit der APAAP-Methode wurden Epithelzell-, Leukozyten-, Makrophagen- und Endothelzellmarker sowie E-Cadherin, die α_2 -, α_4 -, α_5 - und α_v Integrinkette, IGF-I und EGF Rezeptoren, *cerbB2* sowie Cathepsin D immunhistochemisch untersucht. Die Färbungen der Aggregate und der Herkunftsgewebe wurden statistisch mit dem Mann-Whitney Test verglichen.

Ergebnisse: Primäraggregate konnten zu 90-100% aus Operationsresektaten kultiviert werden. Epithelzellen, Leukozyten, Makrophagen und Endothelzellen waren im Primäraggregaten und den Herkunftsgeweben ungefähr gleichmäßig vorhanden. Dies gilt auch für E-Cadherin, α_4 -Integrin, IGF-I und EGF Rezeptoren, *cerbB2* und Cathepsin D.

Die α_2 -, α_5 - und α_v Integrinkette trat nur in den Primäraggregaten von Schilddrüsengeweben und -adenomen nicht aber in deren Herkunftsgeweben auf, was auf eine de-novo Expressierung schließen läßt.

Schlußfolgerung: Mit der verwendeten Methode ist es relativ einfach möglich, organoide Primäraggregate zu züchten, die ein geeignetes Forschungsobjekt für verschiedene Aspekte der Tumorpathologie darstellen. Die gefundenen Unterschiede der Integrinexpression zeigen eine Anpassung an die in-vitro Kultivierung und sind möglicherweise eine Reaktion zur Vermeidung der matrix-abhängigen Apoptose.

Zellkultur, Primäraggregat, Integrine, Tumorpathologie

Immunohistochemical Analysis of primary cell aggregates and their origin tissue of different pathology to evaluate adaptation to in-vitro environment

Objective: Three-dimensional cell cultures reflect more closely the in-vitro environment than monolayer cultures. Furthermore, organoid cultures, which contain beside the dominant tumor cell also mesenchymal cells and leucocytes are used to study the interaction of these cells in several aspects of the tumor pathology, such as metastasis, angiogenesis and tumor immunology.

Materials and Methods: Specimens obtained from thyroid tissue, thyroid adenomas, and carcinomas, ovarian cancer and sarcomas were dissolved to single cell suspensions. After incubation under stirring, primary cell aggregates were cultured within 24-48 hours. Cryostat sections were made and stained with markers of epithelial cells, leucocytes, macrophages, endothelial cells as well as E-cadherin, α_2 , α_4 , α_5 und α_v Integrin chain, IGF-I und EGF receptor, cerbB2 and Cathepsin D using the APAAP method. The immunohistochemical results of the aggregates and their origin tissue were statistically compared using the Mann-Whitney test.

Results: Primary cell aggregates could be obtained from up to 90-100% of all probes. Epithelial cells, leucocytes, macrophages, and endothelial cells were found equally in aggregates and their origin tissue. Also E-Cadherin, α_4 -Integrin, IGF-I und EGF receptors, cerbB2 und Cathepsin D were found equally. The α_2 , α_5 und α_v integrin chain was expressed in aggregates of thyroid tissue and adenomas, but not in their origin tissue suggesting a de-novo expression.

Conclusion: Primary cell aggregates were easily obtained with the used method and could be used as a model in the study of tumor pathology. The different expressions of integrins show an adaptation to the in-vitro environment and could be a reaction to avoid matrix-related apoptosis.

Cell culture, primary aggregates, integrins, tumor pathology

INHALTSVERZEICHNIS

EINFÜHRUNG	7
1 Zellkulturen	7
1.1 Zwei- oder dreidimensionale Zellkultur.....	7
2 Primärzellaggregate	7
3 Zielsetzung dieser Arbeit.....	7
4 Adhäsionsmoleküle	8
4.1 E-Cadherin	8
4.2 Integrine	8
5 Wachstumsfaktorrezeptoren.....	9
5.1 IGF-I-Rezeptor.....	9
5.2 c-erbB Familie.....	10
6 Cathepsin D.....	10
MATERIALIEN UND METHODEN.....	11
1 Herkunft der Gewebe.....	11
2 Gewinnung der Zellaggregate	11
3 Immunhistochemische Färbung.....	12
3.1 Anfertigung der Schnitte	12
3.2 Inkubation.....	12
3.3 Zubereitung der Neofuchsinsubstratlösung.....	15
3.4 Färbung.....	15
4 Positiv- und Negativkontrollen	16
5 Histologische Auswertung	17
6 Statistische Auswertung.....	17
ERGEBNISSE	18
1 Aggregatanzucht.....	18
2 Vergleich der Zellzusammensetzung in Zellaggregaten und Primärgewebe	18
2.1 Epithelzellen.....	19
2.2 Leukozyten.....	20
2.3 Makrophagen.....	22
2.4 Endothelzellen.....	24
2.5 E-Cadherin	25
2.6 α_2 -Integrin	26
2.7 α_4 -Integrin	27
2.8 α_5 -Integrin	28
2.9 α_v -Integrin	30
2.10 IGF-I-Rezeptor.....	32
2.11 EGF-Rezeptor.....	33
2.12 c-erbB2	35

		6
2.13	Cathepsin D	37
DISKUSSION		39
1	Zellaggregate.....	39
1.1	Die Züchtung der Aggregate.....	39
2	Immunhistochemie	39
3	Die immunhistochemischen Resultate.....	39
3.1	Zellzusammensetzung	39
3.2	Epithelzellen.....	40
3.3	Leukozyten.....	40
3.4	Makrophagen- Histiozyten.....	40
3.5	Endothelzellen.....	40
3.6	E-Cadherin	41
3.7	Integrine	41
3.8	IGF-I-R.....	43
3.9	EGF-R	43
3.10	c-erbB 2.....	44
3.11	Cathepsin D	44
4	Primäraggregation	44
5	Schlußbemerkungen.....	45
LITERATUR		46
ANHANG		56

Einführung

1 Zellkulturen

Die Geschichte der Zellkultur begann 1912 mit den Experimenten von Alexis Carrel, der ein 18 Tage altes Hühnerembryoherz über drei Monate kultivierte; es behielt dabei seine Funktion und schlug weiterhin rhythmisch. [1]

Zum ersten Mal wurde gezeigt, daß Gewebekulturen über lange Zeit in-vitro gezüchtet werden können. In-vitro Kultivierungen versuchen, ein möglichst realistisches Abbild der Situation im lebenden Organismus zu erhalten bzw. durch Manipulation von Einflüssen zu neuen Erkenntnissen zu gelangen. Krebsforschung ist ohne Zellkulturen undenkbar, praktisch alle Erkenntnisse über Karzinogenese, Metastasierung, Angiogenese etc. sind an Zellkulturen gewonnen worden. Schließlich finden Zellkulturen auch bei der Entwicklung neuer Therapieformen breite Anwendung.

1.1 Zwei- oder dreidimensionale Zellkultur

Lange Zeit wurden onkologische in-vitro Experimente ausschließlich mit Monolayerkulturen durchgeführt, weil diese relativ leicht zu kultivieren und zu handhaben sind. In Monolayerkulturen werden Zellen auf ein basalmembranähnliches Gel aufgebracht und wachsen wie ein einschichtiges Epithel.

Tumoren wachsen dagegen nie zweidimensional, sondern breiten sich stets von der mutierten Ausgangszelle dreidimensional aus. Zahlreiche Experimente zeigten, daß Monolayer für viele Fragestellungen eine zu stark vereinfachende Kultivierungsmethode sind. [2, 3, 4] Für R. Hoffman ist die Frage der dreidimensionalen Zellkultur so entscheidend, daß er den Titel für ein Review dem berühmten Hamletzitat entlehnte. [5]

In dreidimensionalen Zellkulturen lassen sich Phänomene beobachten, welche auch charakteristisch für Gewebe sind. So ist beispielsweise die Glukosekonzentration in speziellen dreidimensionalen Kulturen vom Kulturdurchmesser abhängig [6]. Die Sauerstoffaufnahme von Zellen in dreidimensionalen Zellkulturen korreliert mit der Proliferationsaktivität [7].

Darüber hinaus zeigen Zellen in dreidimensionalen Kulturen eine unterschiedliche Genexpression [8, 9]

Auch Apoptose [10, 11] und Resistenzen gegenüber Chemotherapeutika und Bestrahlung [12, 13] werden wesentlich über dreidimensionale Zellkontakte gesteuert.

2 Primärzellaggregate

Werden dissoziierte Zellen und Kulturmedium in ein Kulturgefäß gegeben und einer gleichmäßigen Rotation ausgesetzt, verbinden sich diese Zellen zu dreidimensionalen Primäraggregaten. Dieses Phänomen ist seit langem bekannt [14]. Bei der Aggregation spielen physikalische Faktoren, wie zum Beispiel Scherkräfte und Fliehkräfte, elektrostatische und von der Waals Kräfte sowie die sterische Kräfte eine wichtige Rolle [15].

Außerdem ist bekannt, daß auch die Konzentration von Kulturmedienbestandteilen, hier vor allem zweiwertige Kationen, die Aggregation beeinflussen.

Physikalische und chemische Faktoren können allerdings nicht die Beobachtung erklären, daß Zellen oft nach Typ und Polarität aggregieren, mithin die Aggregation in vitro ein biologischer Vorgang ist. Ähnlich wie Bindungen zwischen Enzym und Substrat oder Antikörper und Antigen ist die Aggregation von Zellen hochspezifisch.

Welche Faktoren die Zellaggregation auf molekularbiologischer Ebene beeinflussen, ist dagegen noch wenig bekannt.

3 Zielsetzung dieser Arbeit

In dieser Arbeit wurden aus Operationsresektaten gezüchtete Zellaggregate, gewonnen aus Schilddrüsengewebe, -adenomen und -karzinomen, Ovarialkarzinomen und verschiedenen Weichgewebesarkomen, immunhistologisch untersucht

Parallel dazu wurden auch die Herkunftsgewebe der Zellaggregate gefärbt.

Einerseits wurde mit Antikörpern zur Zellidentifizierung das Auftreten von Epithelzellen, Endothelzellen, Leukozyten und Makrophagen untersucht.

Darüber hinaus sollten aber auch Adhäsionsmoleküle, Wachstumsfaktorrezeptoren und eine Protease untersucht werden, um so auch auf molekularer Ebene einen Vergleich zwischen Zellaggregaten und ihrem Herkunftsgewebe durchführen zu können.

Folgende Fragestellungen sollten werden:

Können mit einer relativ einfachen Anzuchtmethode Aggregate aus Humangewebe gewonnen werden?

Welche Zellen bilden das Aggregat? Sind Tumorzellen, Fibroblasten, Leukozyten und andere Zellen des Herkunftsgewebes über/unterrepräsentiert?

Entspricht das Auftreten onkologisch wichtige Parameter in Zellaggregaten dem der Herkunftsgewebe?

4 Adhäsionsmoleküle

4.1 E-Cadherin

Cadherine sind für den Erhalt der Gewebsarchitektur verantwortlich und für die selektive Zellerkennung und -adhäsion im Verlauf der Embryogenese von entscheidender Bedeutung [16].

Sie bilden die Familie der kalziumabhängigen Adhäsionsmoleküle, wichtigstes Mitglied ist das epitheliale (E) Cadherin, weitere Cadherine sind das Plazenta = P-Cadherin, das neuronale = N-Cadherin und das muskelspezifische = M-Cadherin; ebenfalls gehören zu dieser Familie die desmosomalen Proteine Desmoglein und Desmocollin. [17]

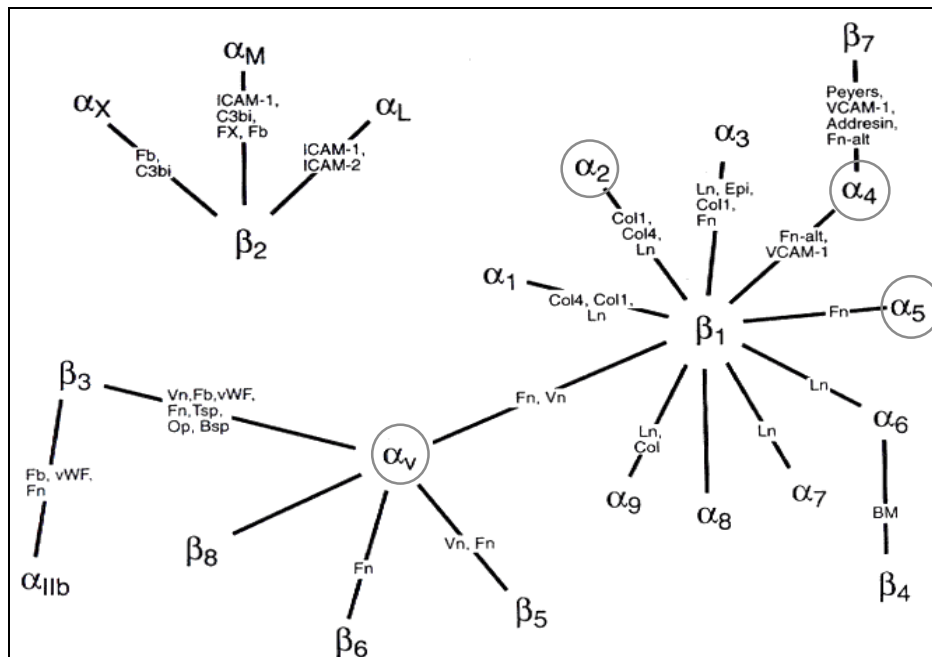
Wichtigste Funktion ist die homotypische Adhäsion benachbarter Zellen, die durch Cadherine wie die zwei Hälften eines Reißverschlusses aneinandergelockt werden. [18]

E-Cadherin ist ein einkettiges transmembranöses Protein, der extrazelluläre Anteil dient der Adhäsion, die zytoplasmatische Domäne ist über Catenine entweder mit dem Zytoskelettbestandteil Actin oder mit Intermediärfilamenten in Desmosomen verbunden. Die Funktion der cadherinvermittelten Zelladhäsion wird über diese Verbindungen beeinflusst. [19, 20] In Tumoren geht reduzierte Expression mit gelockertem Zellverbund und erhöhter Invasivität einher. [21] Es wurde auch eine Aufhebung der Cadherinfunktion durch Proteoglykane beschrieben. [22] Für viele Tumore ist E-Cadherin deshalb ein wichtiger Prognosefaktor. [23, 24]

4.2 Integrine

Integrine scheinen die wichtigsten Adhäsionsmoleküle bei Interaktionen zur Extrazellulärmatrix und wichtige Adhäsionsmoleküle bei Zell-Zellverbindungen zu sein. [25] So steuern beispielsweise Integrine die Adhäsion von Leukozyten an Endothelzellen. Integrine vermitteln die Thrombozytenaggregation und die Interleukinfreisetzung von Monozyten. [26]

Integrine sind Heterodimere mit α - und β -Ketten, wobei eine α -Kette (120-180 kD) nonkovalent mit einer β -Kette (90-110 kD) verbunden ist. Bis jetzt sind 18 α - und 8 β -Ketten analysiert worden, die 24 bekannte Heterodimere bilden.



schematische Darstellung wichtiger Integrinpaare mit den zugehörigen Liganden nach Aota und Yamada [27]

(Fn = Fibronectin, zentrale Bindungsregion, Fn-alt = Fibronectin, alternative gespligte Region, LN = Laminin, Epi = Epiligrin (Kalligrin), Fb = Fibrinogen, Col1 = Kollagen Typ I, Col4 = Kollagen Typ IV, vWF = von Willebrandt Faktor, Op = Osteopontin, Tsp = Thrombospondin, C3bi = Komplementkomponente C3bi, Peyer = Peyersche Plaque, FX = Faktor X, Bsp = bone sialoprotein 1)

Die in dieser Arbeit untersuchten Integrinmonomere sind mit einem Kreis markiert.

Die Verbindung der extrazellulären Enden bildet die Ligandenbindungsstelle. Zweiwertige Kationen sind für die Ligandenbindung und bei manchen Integrinen auch für die Heterodimerenbildung erforderlich. Sie beeinflussen auch die Affinität und Spezifität der Interaktion. [28] Das Vorhandensein von Integrin und zugehörigem Ligand bewirkt nicht zwangsläufig eine Interaktion; die Affinität der Beziehung ist variabel. Die zyttoplasmatische Domäne ist der Beginn einer weitverzweigten Signalkette, [29, 30] über die Integrine Morphologie, Motilität und Adhäsionsverhalten der Zelle beeinflussen oder auch die Synthese von Proteinen oder Enzymen bewirken.

In der Tumorphathologie spielen Integrine beim Tumorwachstum, der Metastasierung, der Tumorangiogenese und in der Tumorummunologie eine herausragende Rolle. [31, 32] Oft ändert sich das Spektrum der exprimierten Integrine, so können beispielsweise Neoplasien der Schilddrüse nachgewiesen werden. [33]

4.2.1 Die untersuchten Integrine

Für die Untersuchungen der Integrinexpression in Zellaggregaten wurden die $\alpha_2\beta_1$; $\alpha_4\beta_1$; $\alpha_5\beta_1$ und die $\alpha_v\beta_3$ Integrinmonomere ausgewählt. Sie besitzen in der onkologischen Forschung besondere Bedeutung, weil über die durch sie gebildeten Integrine Proliferation, Apoptose von Zellen beeinflusst werden.

$\alpha_2\beta_1$ (CD 49b) ist ein Kollagenrezeptor.

$\alpha_5\beta_1$ (CD 49e) ist ein Fibronectinrezeptor.

$\alpha_4\beta_1$ (CD 49d) bindet ebenfalls an Fibronectin und darüber hinaus an das vascular cell adhesion molecule (VCAM). Für Sarkome ist die Bindung an VCAM als wichtiger Metastasierungsschritt beschrieben worden. [34]

$\alpha_v\beta_3$ (CD 51) besitzt in der Verbindung mit α_3 wesentliche Bedeutung in der Tumorphathologie, dabei vor allem bei der Angiogenese. [35] Mit diesem Integrin ist die Bindung an eine Vielzahl von Matrixproteinen und auch an denaturierte Matrix möglich.

5 Wachstumsfaktorrezeptoren

Wachstumsfaktoren spielen eine bedeutende Rolle bei der Kontrolle von Zellwachstum und Differenzierung, Migration, Stoffwechsel und Transformation der Zelle. [36, 37, 38] Die im folgenden besprochenen Wachstumsfaktorrezeptoren wirken als Tyrosinkinasen, die sich nach Bindung an einen Liganden mit einem zweiten Rezeptormolekül verbinden und schließlich autophosphorylieren. Über eine Signalkette werden im Zellkern Transkription und Translation aktiviert. Überexpression von Wachstumsfaktorrezeptoren ist daher meist ein Marker für gesteigerte Proliferation und Zellteilung und somit ein ungünstiges Prognosezeichen einer Tumorerkrankung.

5.1 IGF-I-Rezeptor

Für optimales Zellwachstum in vivo und in-vitro ist der IGF-I-Rezeptor unentbehrlich; fehlt er, ist das Wachstum um bis zu 70% verringert. [39]

Laut Baserga ist der IGF-I-R „quasi obligatorisch“ für eine maligne Zelltransformation und deren Aufrechterhalten. Diese Aussage begründet sich dadurch, daß untersuchte Maus- Fibroblasten mit genetisch verändertem IGF-I-Rezeptor auf folgende Onkogene nicht mit einer Zelltransformation reagierten: SV40 large T Antigen [40], aktiviertes ras sowie die Kombination aktiviertes ras und T Antigen [41], das bovine Papillomavirus E5 protein [42], der humane Papillomavirus [43], aktiviertes c-src, Ewing sarcoma fusion protein [44] sowie die Wachstumsfaktorrezeptoren EGF-R [45], PDGF- [46] und der Insulinrezeptor [47]. Weiterhin schützt der IGF-I-Rezeptor Tumorzellen vor Apoptose. [48]

Diese Eigenschaften machen den IGF-I-Rezeptor zu einem sehr geeigneten Ansatzpunkt therapeutischer Strategien.

5.2 c-erbB Familie

Zur Familie der Typ 1 Wachstumsfaktor-Tyrosinkinasen gehören zur Zeit 4 Mitglieder: der epidermal growth factor receptor (EGFR, c-erbB 1); c-erbB 2 (Her 2/neu), c-erbB 3 und c-erbB 4. Bemerkenswert ist die Möglichkeit der Bildung von Heterodimeren aus verschiedenen c-erb Molekülen. [49, 50] Dadurch können mehr Liganden an einen Rezeptor binden oder die Signaltransduktionen in der Zelle verändert werden.

An den EGF-Rezeptor binden TGF- und EGF, die Liganden für c-erbB2 werden unter den neu-differentiation factors bzw. Heregulinen zusammengefaßt. Bisher sind 9 Liganden bekannt, die aber z.T. nur indirekt unter Mitwirkung eines möglicherweise katalysierend wirkenden Akzessormoleküls binden. [51]

Der EGF-Rezeptor spielt zudem eine wichtige Rolle in der Embryogenese. [52]

Ein „autocrine loop“ ist für den EGF-Rezeptor beschrieben worden, dieses Molekül kann also nach Stimulation durch einen Liganden seine Expression steigern. [53]

Eine Überexpression von EGF-Rezeptoren korreliert teilweise, eine Überexpression von c-erbB2 sehr stark mit einer schlechten Prognose insbesondere bei Mamma- und Ovarialkarzinomen. [54, 55, 56] Gegenüber einer chemotherapeutischen Behandlung zeigen sich c-erbB2 positive Tumoren stärker resistent. [57, 58] c-erbB2 gilt auch als Ziel antikörpergesteuerter Therapien.

6 Cathepsin D

Cathepsin D zählt zu der Gruppe der Proteasen. Proteasen ermöglichen Tumorzellen das Ablösen von der extrazellulären Matrix und durch die Andauung von Basalmembranen und Gefäßen Invasion und Metastasierung. [59] Mindestens 8 Proteasen spielen in diesen Prozeß eine Rolle, die wichtigsten sind Kollagenasen, Plasminogenaktivatoren und Cathepsine.

Physiologische Bedeutung haben Proteasen bei der Ovulation, der Rückbildung der Mammæ nach Laktation und bei der Freisetzung von Hormonen aus ihren Pro-Formen.

Cathepsine wirken in den Zelllysosomen an der Lysis von Matrixbestandteilen mit.

Cathepsin D ist eine aspartatische saure Protease, sie lysiert Laminin, Fibronectin und Proteoglykane an hydrophoben aromatischen Stellen. [60]

In dichten Zellverbänden überwindet Cathepsin D einen putativen Wachstumsstillstand durch intrazelluläre Auflösung von Wachstumsinhibitoren. [61] Pro-Cathepsin D bindet an den Mannose-6-phosphat-Rezeptor und wirkt so auch als Wachstumsfaktor. [62]

Höhere Konzentrationen von Cathepsin korrelieren mit höherer Invasivität und damit schlechterer Prognose in Mamma-[63] Endometrium- [64] und Schilddrüsenkarzinomen. [65]

Materialien und Methoden

1 Herkunft der Gewebe

Für die Aggregatherstellung wurden folgende Gewebe aus der Pathologischen Abteilung des Robert-Rössle-Krankenhauses genutzt:

1. Schilddrüsengewebe, gewonnen aus tumorfreien Bereichen nach Thyroidektomien,
2. Schilddrüsenadenomgewebe, gewonnen aus Präparaten nach Strumaresektion,
3. Schilddrüsenkarzinomgewebe, gewonnen aus tumorbefallenen Bereichen nach Thyroidektomien,
4. Ovarialkarzinomgewebe, welches bei Debulkingoperationen entfernt wurde,
5. Weichgewebssarkomgewebe, gewonnen nach chirurgischer Entfernung bzw. Resektion.

Für die Versuche waren Gewebevolumina von ca. 2cm^3 erforderlich. Da die Operationsresektate vorrangig für die klinische Diagnostik genutzt wurden, stand nicht bei allen Versuchen genügend Material zur Verfügung. In diesen Fällen wurde auf die Entnahme von Material für die Referenzgewebeschnitte verzichtet.

Da zum Zeitpunkt der Aggregatherstellung die endgültige histologische Diagnose noch nicht bekannt war, erfolgte die Klassifizierung der Zellaggregate und Gewebe erst nach der endgültigen histologischen Untersuchung in der Pathologischen Abteilung.

2 Gewinnung der Zellaggregate

Die Zellaggregate wurden nach der Methode von Peters [66] bzw. Hoover [67] gezüchtet, welche im chirurgisch-onkologischem Labor des MDC weiterentwickelt wurde.

Alle Schritte der Aggregatkultur erfolgten unter sterilen Bedingungen, alle Zelltransfers wurden in einer sterilen Kammer durchgeführt

Bis zur Aufarbeitung lagerten die frischen Gewebeproben bei 4°C in HBSS-Lösung. Alle Gewebe wurden innerhalb von 24 Stunden nach Entnahme im OP weiterverarbeitet.

Zunächst erfolgte die Zerkleinerung des Gewebes in möglichst kleine Fragmente mit einem Skalpell. Makroskopisch sichtbare Bindegewebsanteile und Nekrosen wurden entfernt.

Es schloß sich die enzymatische Gewebsdissoziation mit Kollagenase/DNAse in HBSS in einer Trypsinierungsflasche bei 37°C über 60 Minuten an. Die Lösung wurde mit einem Magnetrührer ständig aufgewirbelt. Die Gewebedissoziation wurde durch Filtration durch $40\mu\text{m}$ Gaze und Zentrifugieren (1000 U/min) des Filtrats mit anschließendem Dekantieren der Enzymlösung abgebrochen.

Zur Reinigung der Zellsuspension wurden die Zellen in HBSS-Lösung aufgelöst und bei 1000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und die Zellen in frischer Lösung mit dem Vortex-Schüttler aufgewirbelt. Diese Reinigung wurde einmal wiederholt.

Mit einer Pipette wurde dann ein Tropfen der Zellsuspension auf einen Objektträger gegeben und unter dem Mikroskop der Dissoziationsgrad der Zellen überprüft.

Anschließend wurden die Zellen in Nährmedium überführt. Als Nährmedium wurde Iscoves Medium mit den Zusätzen fetales Kälberserum, Streptomycin und Penicillin verwendet.

Schließlich wurden die Zellen in verschlossenen, silikonisierten Erlenmeyerkolben unter bei 37°C in gleichförmiger kreisender Bewegung (71 U/Min) 24 Stunden inkubiert.

Zeigte sich nach 24 Stunden eine ungenügende Aggregation, wurde die Inkubation mit erneuertem Medium um erneut 24 Stunden bei gleichen Bedingungen verlängert. Keine Kultur wurde länger als 48 Stunden inkubiert.

Bei makroskopisch sichtbaren Aggregaten wurden die Kulturen aus dem Inkubator entnommen und die nach unten sinkenden Aggregate sorgfältig abpipettiert

Aus jeder Kultur wurden einige Aggregate auf einen Objektträger gegeben, mit Trypanblau überschichtet und die Zellvitalität untersucht.

Die Mehrzahl der Aggregate wurde, mit Eindeckmedium überschichtet, in flüssigem Stickstoff eingefroren. Bis zur immunhistochemischen Färbung lagerten die Zellaggregate bei -80°C .

Übersicht über die verwendeten Materialien

Material	Hersteller	Konzentration
HBSS, Hanks's gepufferte Salzlösung	Life Technologies (GibcoBRL)	
Collagenase I	Sigma	0,14 % in HBSS ¹
DNAse	Sigma	0,1 % in HBSS ¹
Iscove's modifiziertes Dulbecco's Medium	Life Technologies (GibcoBRL)	
fetales Kälberserum	Life Technologies (GibcoBRL)	10 % in Iscove's Medium
Penicillin	Biochrom	100 U/ml
Streptomycin	Biochrom	100µg/ml
Trypanblau	Biochrom	
Einbettmedium	Jung	
Cryocut 3000	Leica	
Acetone	Merck	

3 Immunhistochemische Färbung

3.1 Anfertigung der Schnitte

Von den Zellaggregaten wurden 5 µm dicke Gefrierschnitte angefertigt. Ein Schnitt wurde sofort mit Hematoxylin-Eosin gefärbt und unter dem Mikroskop beurteilt. Zeigte sich ein für die Immunhistochemie ausreichend großes Aggregat, konnten die direkt hinter dem HE-Schnitt liegenden Schnitte für die immunhistochemische Untersuchung verwendet werden.

Diese wurden ca. 12 Stunden luftgetrocknet und anschließend 10 Minuten in Azeton fixiert. Die Objektträger lagerten, eingewickelt in Aluminiumfolie, bis zur endgültigen Färbung bei -80°C.

3.2 Inkubation

Die immunhistochemische Behandlung erfolgte mit der APAAP-Methode nach Cordell et al. [68]

Am Vortag wurden die für die Immunhistochemie vorgesehenen Schnitte in -20°C umgelagert.

Nachdem sich die Schnitte langsam auf Raumtemperatur erwärmt hatten, erfolgte erneut eine zehnminütige Azetonfixierung. Anschließend lagerten die Schnitte in einer Azeton-Tris-Pufferlösung im Verhältnis 1:2, schließlich in Trispuffer für jeweils 10 Minuten. Diese Fixierung erfolgte nicht bei den Antikörpern gegen IGF-I-R, EGF-R, 2; 4; 5.

Alle Antikörper wurden mit RPMI-Ansatz verdünnt, die Sekundärantikörperverdünnung enthielt zusätzlich Humanserum zur Blockade jeglicher Kreuzreaktionen mit menschlichem Immunglobulin. Die Inkubation mit

¹ Enzyme wurden bei 37°C gelöst und durch ein 0,2µm Sieb filtriert

Primär- und Sekundärantikörper bzw. mit dem APAAP-Komplex wurde in dem Coverplate -System im Sequenza durchgeführt. Die Inkubationszeiten betrugen für den Primärantikörper 1 Stunde, für Sekundärantikörper und APAAP-Komplex jeweils 30 Minuten. Danach erfolgte eine jeweils zehnminütige Verstärkungsinkubation mit dem Sekundärantikörper und dem APAAP-Komplex. Zwischen jedem Inkubationsschritt wurden die Schnitte 6 Minuten mit Tris-Puffer gespült.

Übersicht über verwendete Antikörper

verwendeter Primärantikörper	Clone	Hersteller	Konzentration	Positivkontrolle
monokl. Maus anti-Human CD 31	JC/70A	Dako	1:100	Plazenta
monokl. Maus anti-Human CD 45	T 29/33	Dako	1:100	Tonsille
monokl. Maus anti-Human CD 68	PG-M1	Dako	1:100	Tonsille
monokl. Maus anti-Human	HEA 125	Progen	gebrauchsfertig bzw. 1:10	Haut
monokl. Maus anti-Human E-Cadherin	HECD-1	Takara Shuzo Co. Ltd	1:1000	Haut
monokl. Maus anti-Human CD 49b	Gi9	Immunotec	1:50	Haut
monokl. Maus anti-Human CD 49d	HP2/1	Immunotec	1:50	Haut
monokl. Maus anti-Human CD 49e	SAM1	Immunotec	1:50	Haut
monokl. Maus anti-Human CD 51	AMF7	Immunotec	1:50	Haut
monokl. Maus anti-Human IGF-I Rezeptor	IR3	Oncogene Science	1:20	Plazenta [69]
monokl. Maus anti-Human EGF-I-Rezeptor	E 30	BioGenex	1:20	Haut
polyklonal Kaninchen anti-Human c-erbB 2		Dako	1:200	Mamma Ca.
polyklonal Kaninchen anti-Human Cathepsin D		Dako	1:200	Mamma Ca.
verwendete Sekundärantikörper				
monokl. Kaninchen anti-Maus IGg	Z 259	Dako	1:20	
monokl. Maus anti Kaninchen IGg	Z 737	Dako	1:200	
APAAP-Komplex		Dako	1:40	

3.3 Zubereitung der Neofuchsinsubstratlösung

Während der letzten APAAP-Inkubation wurde die Neofuchsinsubstratlösung wie folgt angesetzt:

1. 40 mg Levamisole wurde in 25 ml Propandiol-Stammpuffer + 70 ml Entwicklungspuffer gelöst
2. 50 mg Naphtol-AS-Bi-Phosphat wurde in 600 µl N, N-Dimethylformamid gelöst
3. 20 mg Natriumnitrit wurde in 500 µl Aqua pro injectione gelöst, 200 µl Neofuchsin dazugegeben.

Die angegebenen Werte beziehen sich auf 100 ml Lösung.

Nach einer Minute wurde in die Lösung 1) die Lösung 2) dann die Lösung 3) gegeben, der pH-Wert auf 8,8 mit 2N NaOH eingestellt und die Substratlösung filtriert.

3.4 Färbung

Für die anschließende Färbung mit Neofuchsinsubstratlösung wurden die Objektträger aus dem Coverplate -System herausgenommen und in die wenige Minuten zuvor zubereitete Lösung gebracht. Die 30 minütige Inkubation erfolgt auf dem Schüttelgerät.

Danach wurden die Objektträger zweimal in Tris-Puffer gespült, für die Kernfärbung 1 Minute mit Hemalaun gefärbt, 2 Minuten gewässert, und schließlich mit Glyzeringelatine eingedeckelt.

Übersicht über verwendete Materialien

Material	Bezugsfirma / Herstellung
Tris Base	Merck
Tris - Puffer	12,1 g Tris + 17,0 g NaCl ad 2000 ml Aqua dest.
Tris-Säure	Merck
Entwicklungspuffer	4,9 g Tris-Base + 1,5 g Tris-HCl + 8,7 g NaCl ad 100 ml Aqua dest.
RPMI 1640	Seromed
Natriumazid	Merck
inaktives Rinderserum	Seromed
RPMI-Ansatz:	25ml RPMI 1640+ 225 ml Aqua bidest + 25ml inaktives Rinderserum + 250 mg Natriumazid bei pH 7,4-7,6
Coverplates	Shandon
Sequenza	Shandon
2-Amino-2-methyl-1,3-propandiol	Merck
Propandiol-Stammpuffer:	21 g 2-Amino-2-methyl-1,3-propandiol ad 1000 ml Aqua dest.
Levamisole	Sigma
Naphtol-AS-BI-Phosphat	Sigma
N, N-Dimethylformamid	Merck
Neofuchsinlösung	Chroma
Natriumnitrit	Merck
Hematoxilin	Herstellung im eigenem Labor
Kaisers Glyzeringelatine	Merck

4 Positiv- und Negativkontrollen

Mit einer Positivkontrolle wurden alle Antikörper auf ihr Bindungsverhalten getestet. Zeigte sich eine spezifische Reaktion, konnte die günstigste Antikörperverschüttung mit einer Verschüttungsreihe, die sich an der vom Hersteller vorgeschlagenen Konzentration orientierte, ermittelt werden.

Zum Ausschluß einer unspezifischen Farbreaktion wurden Negativkontrollen mit dem Ausschluß des Primärantikörpers bei sonst identischer Färbeprozedur durchgeführt.

5 Histologische Auswertung

Die histologische Auswertung in allen Aggregat- und allen Primärgewebeschnitten erfolgte nach folgendem Score

keine Zelle positiv	-
wenig Zellen fraglich positiv	+/-
einige Zellen deutlich positiv	+
Hälfte der Zellen positiv	++
(fast) alle Zellen positiv	+++

6 Statistische Auswertung

Der Vergleich der immunhistochemischen Scores in Zellaggregaten und deren Herkunftsgewebe wurde mit dem Mann-Whitney Test für Rangsummen durchgeführt. Es wurde der Score für jeden Antikörper bei Zellaggregaten und Primärgeweben nach Gewebegruppe (Schilddrüsengewebe, -adenom, -karzinom, Ovarialkarzinom und Weichgewebesarrkome) getrennt verglichen. Ein p-Wert kleiner als 0,05 wurde als statistisch signifikant verschieden angesehen.

Ergebnisse

1 Aggregatanzucht

Alle Zellaggregate wurden zuerst in der HE-Färbung untersucht.

Als Kriterium für eine erfolgreiche Anzucht von Zellaggregaten wurde die voraussichtliche Beurteilungsmöglichkeit immunhistochemischer Färbungen gewählt. Die Anzucht galt als erfolgreich, wenn die Zellaggregate groß genug für eine immunhistologische Auswertung waren.

Die Anzuchttrate ist folgender Tabelle zu entnehmen.

Art des Gewebes	Anzahl der Ansätze	Ansätze mit immunhistologisch verwertbaren Zellaggregaten	Prozent
Schilddrüsengewebe	20	18	90
Schilddrüsenadenom	19	19	100
Schilddrüsenkarzinom	5	5	100
Ovarialkarzinom	6	6	100
Weichgewebssarkom	16	16	100

Bei der Auswertung der HE-Färbung wurden folgende Beobachtungen gemacht:

- Gewebetypische Merkmale insbesondere Schilddrüsenfollikel, Gefäßformationen oder Bindegewebsstrukturen konnten in Zellaggregaten nicht nachgewiesen werden.
- Schilddrüsengewebe und Schilddrüsenadenomzellen aggregierten zu größeren homogenen Zellaggregaten, maligne Zellen bildeten eher mehrere kleine Aggregate.
- Risse und Spaltbildungen wurden als Artefakte betrachtet, die während des Einfrierens oder beim Anfertigen der Gefrierschnitte entstanden waren.

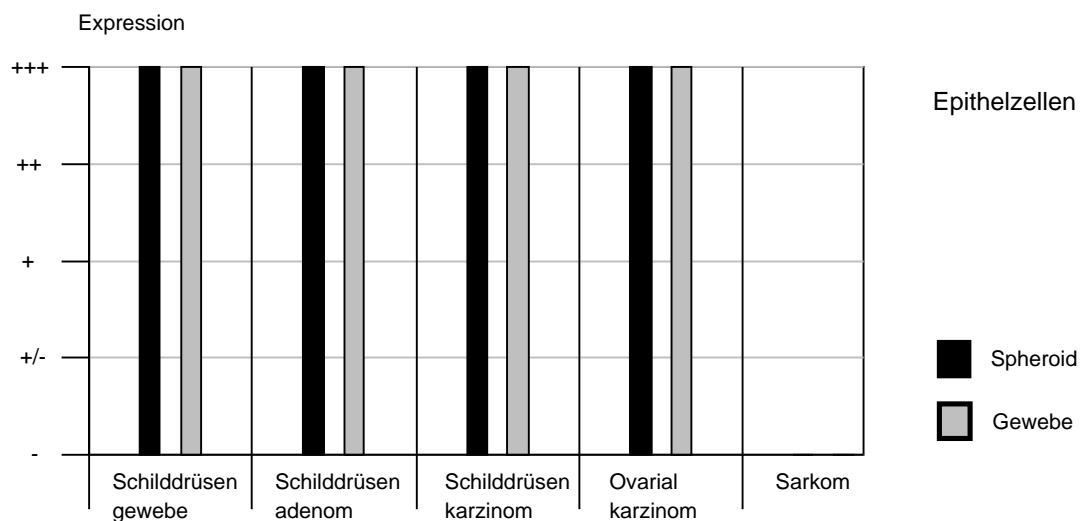
2 Vergleich der Zellzusammensetzung in Zellaggregaten und Primärgewebe

Das Ziel dieser Arbeit war der immunhistologische Vergleich von organotypischen Zellaggregaten und deren Herkunftsgewebe. Zur Bestimmung von Epithelzellen, Endothelzellen, Leukozyten und Makrophagen wurden entsprechende markierende Antikörper eingesetzt. Alle weiteren Moleküle wurden mit ihren entsprechenden monoklonalen, bei c-erbB2 und Cathepsin D polyklonalen, Antikörpern detektiert. Für die Aggregatherstellung eine Gewebemenge von ca. 2cm³ benötigt. Diese stand insbesondere nach Schilddrüsenresektionen nicht immer zur Verfügung. Deshalb war der Vergleich nicht in allen Proben möglich.

2.1 Epithelzellen

Der Anteil von Epithelzellen lag in Zellaggregaten und deren Primärgeweben bei über 90%. Dies gilt für Proben epithelialer Herkunft. Zellaggregate und Primärgewebe mesenchymaler Herkunft waren erwartungsgemäß negativ. Der statistische Vergleich der histochemischen Färbereaktion ergab keinen signifikanten Unterschied.

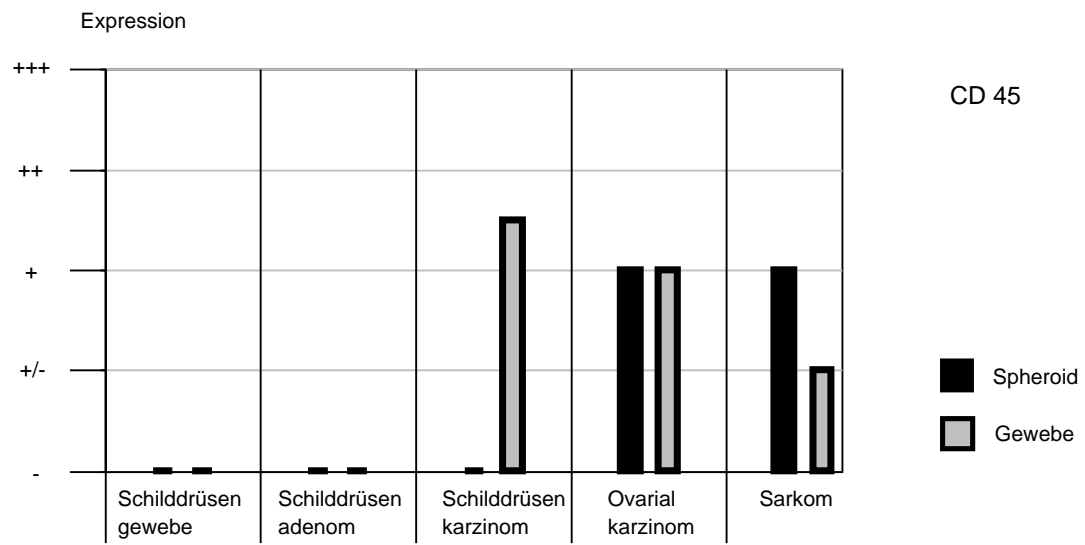
HEA 125		Anzahl						p-Wert
		gesamt	-	+/-	+	++	+++	
Schilddrüsengewebe	Aggregat	14					14	0,5673
	Primärgewebe	9					9	
Schilddrüsenadenom	Aggregat	18			1	2	15	0.4876
	Primärgewebe	7			1	1	5	
Schilddrüsenkarzinom	Aggregat	9		1	1		7	0.4844
	Primärgewebe	2					2	
Ovarialkarzinom	Aggregat	6	1		1		4	0.8774
	Primärgewebe	3	1				2	
Sarkom	Aggregat	14	13	1				0.5501
	Primärgewebe	5	5					



2.2 Leukozyten

In Schilddrüsennormalgewebe und Schilddrüsenadenomen konnten im Primärgewebe keine oder nur wenige Leukozyten gefunden werden. In Zellaggregaten war das Auftreten nicht signifikant verschieden. In Aggregaten von Schilddrüsenkarzinomzellen konnten mehr Leukozyten nachgewiesen werden, allerdings läßt die geringe Anzahl der untersuchten Primärgewebe keinen abschließenden Vergleich zu. Bei den zwei Vergleichsmöglichkeiten wurden entsprechende Expressionen gefunden. Die Analyse der Ovarialkarzinome und der Sarkome lieferte ebenfalls eine ähnliche Expression von Leukozyten in Zellaggregaten und deren Herkunftsgewebe.

CD 45		Anzahl						p-Wert
		gesamt	-	+/-	+	++	+++	
Schilddrüsen- gewebe	Aggregat	17	12	3	2			0.775
	Primär- gewebe	11	7	3	1			
Schilddrüsen- adenom	Aggregat	17	13	1	3			0,7697
	Primär- gewebe	7	5	1		1		
Schilddrüsen- karzinom	Aggregat	8	5	1	1	1		0.0924
	Primär- gewebe	2			1	1		
Ovarialkarzin- om	Aggregat	7	1	1	3	2		0,9049
	Primär- gewebe	3	1		1	1		
Sarkom	Aggregat	14	6		3	2		0,6401
	Primär- gewebe	4	2			2		

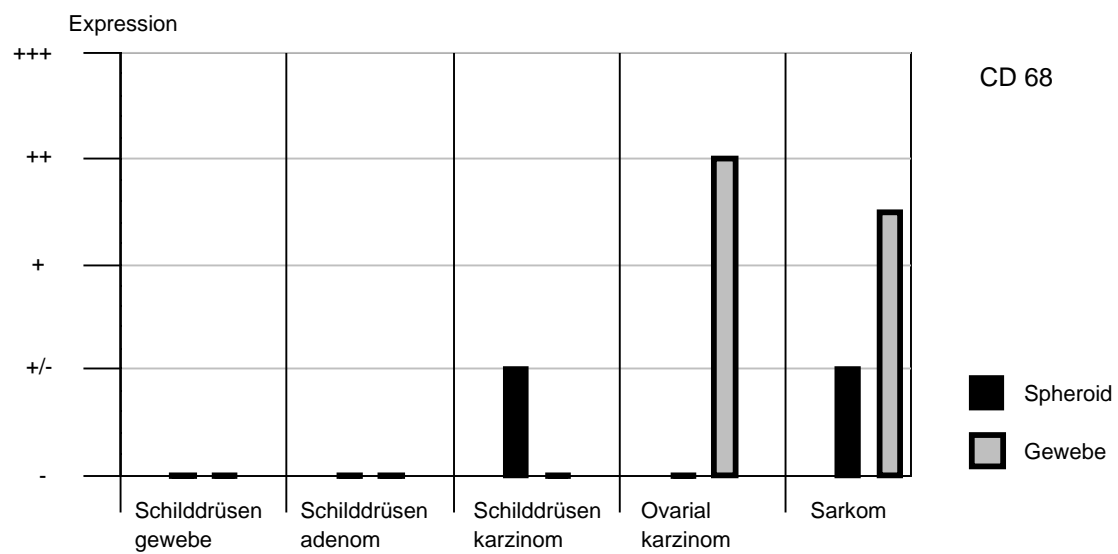


2.3 Makrophagen

In nichtmalignen Schilddrüsenprimärgeweben wurden keine oder wenige Makrophagen gefunden, in den daraus gewonnenen Zellaggregaten fanden sich entsprechende Verteilungen.

Die Primärgewebe aus Ovarialkarzinomen zeigten relativ viele markierte Makrophagen, die in den daraus gezüchteten Zellaggregaten zweimal fraglich und in einem Fall nicht mehr nachgewiesen werden konnten. Der hier vermutete Trend, daß Makrophagen in Zellaggregaten nicht mehr vertreten sind, tritt in Aggregaten von Schilddrüsenzellen und bei Sarkomen nicht auf. Daneben ist bei den drei möglichen Vergleichen eine gewisse Kongruenz - die aus makrophagenreichen Primärgewebe gezüchteten Zellaggregate stellen die zwei fraglich positiven Vertreter - zu verzeichnen.

CD 68		Anzahl						p-Wert
		gesamt	-	+/-	+	++	+++	
Schilddrüsen- ewebe	Aggregat	15	9	4	1	1		0,6022
	Primär- gewebe	11	7	3	1			
Schilddrüsen- adenom	Aggregat	17	16	1				0,5211
	Primär- gewebe	7	7					
Schilddrüsen- karzinom	Aggregat	8	3	2	1	2		0,1606
	Primär- gewebe	2	2					
Ovarialkarzinom	Aggregat	7	5	2				0,9094
	Primär- gewebe							
Sarkom	Aggregat	9	4	3	1	1		0,1495
	Primär- gewebe	4	1		1	1	1	



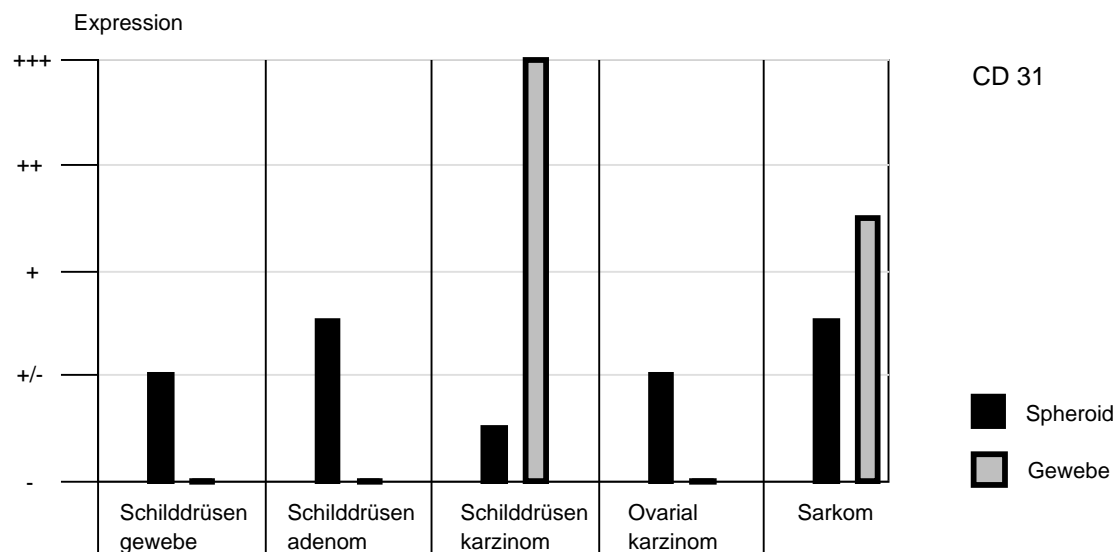
2.4 Endothelzellen

Endothelzellen wurden in nichtmalignen Schilddrüsenprimärgeweben nicht detektiert. In malignen Geweben wurden mehr Endothelzellen gefunden.

In allen Zellaggregaten zeigte sich eine stärkere Färbung, die sich bei den Schilddrüsenaggregaten und Schilddrüsenadenomen statistisch signifikant unterschied.

Die Gefäßstruktur war in den Zellaggregaten nicht mehr auffindbar, es fanden sich aber oft Nester mit mehreren positiven Zellen.

CD 31		Anzahl						p-Wert
		gesamt	-	+/-	+	++	+++	
Schilddrüsen- gewebe	Aggregat	17	5	5	2	5		0,0005
	Primär- gewebe	11	11					
Schilddrüsen- adenom	Aggregat	16	3	5	5	1	2	0,0013
	Primär- gewebe	7	7					
Schilddrüsen- karzinom	Aggregat	8	4	1	1	1	1	0,1549
	Primär- gewebe	1					1	
Ovarialkarzinom	Aggregat	7	3	2	2	1		0,112
	Primär- gewebe	3	3					
Sarkom	Aggregat	14	5	2	3	2	2	0,5641
	Primär- gewebe	4	1		1	2		

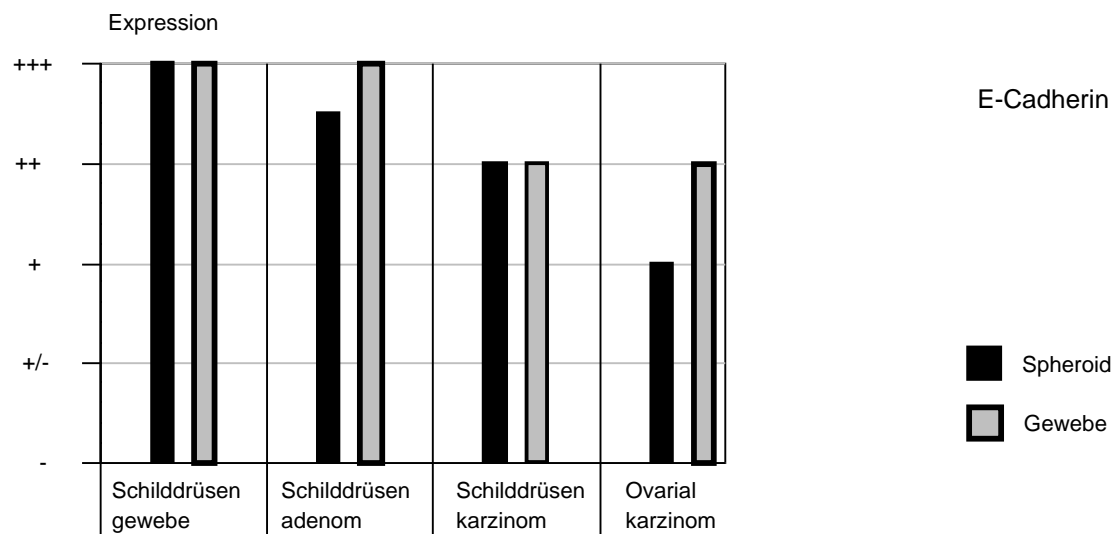


2.5 E-Cadherin

Alle nichtmalignen Schilddrüsenprimärgewebe zeigten eine starke E-Cadherinexpression, die sich auch in den meisten Zellaggregaten wiederfand. Die E-Cadherinfärbung war in malignen Geweben etwas schwächer, auch in den daraus kultivierten Zellaggregaten. Der statistische Vergleich ergab keinen Unterschied der Expression.

Sarkome sind definitionsgemäß mesenchymaler Herkunft. In der Untersuchung mit dem Epithelzellmarker HEA 125 konnte keine Epithelzellen nachgewiesen werden. Daher wurde auf die Färbung der Sarkome mit dem E-Cadherinantikörper verzichtet.

E-Cadherin		Anzahl						p-Wert
		gesamt	-	+/-	+	++	+++	
Schilddrüsen- ewebe	Aggregat	17	1	1	1	3	11	0,465
	Primär- gewebe	9					9	
Schilddrüsen- adenom	Aggregat	16		1	2	5	8	0,5297
	Primär- gewebe	7				3	4	
Schilddrüsen- karzinom	Aggregat	6		1	1	4		0,5297
	Primär- gewebe	1				1		
Ovarialkarzinom	Aggregat	7		1	4	1	1	0,3682
	Primär- gewebe	3			1	2		

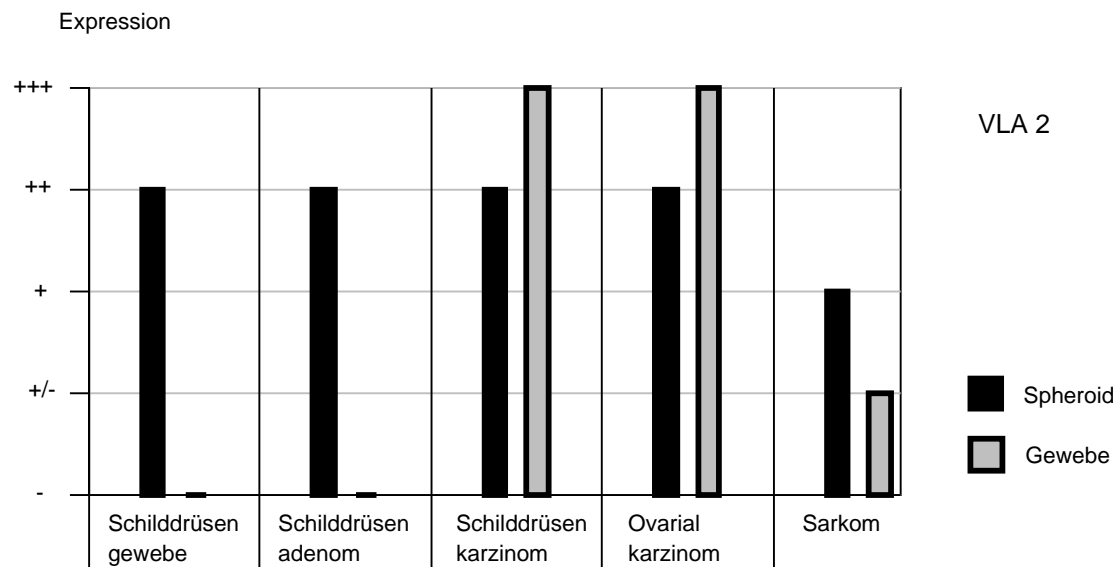


2.6 α_2 -Integrin

Die nichtmalignen Schilddrüsenprimärgewebe waren ausnahmslos negativ bei der Färbung mit dem anti- α_2 Antikörper, während in vielen Zellaggregaten eine starke bis sehr starke Färbung beobachtet werden konnte. Der niedrige p-Wert beweist einen signifikanten Unterschied.

In allen malignen Primärgeweben konnte α_2 nachgewiesen werden. Daher ergab die ebenfalls starke Expression in Zellaggregaten keinen statistisch signifikanten Unterschied beim Vergleich der Expression.

VLA 2		Anzahl						p-Wert
		gesamt	-	+/-	+	++	+++	
Schilddrüsen- gewebe	Aggregat	18	3	1	2	8	4	0,0001
	Primär- gewebe	11	11					
Schilddrüsen- adenom	Aggregat	16	2	1	2	7	4	0,0012
	Primär- gewebe	6	6					
Schilddrüsen- karzinom	Aggregat	8				2	6	0,4533
	Primär- gewebe	2					2	
Ovarialkarzinom	Aggregat	7			1	4	2	0,6256
	Primär- gewebe	3			1		2	
Sarkom	Aggregat	14	1	5	4	4		0,0666
	Primär- gewebe	5	2	2	1			

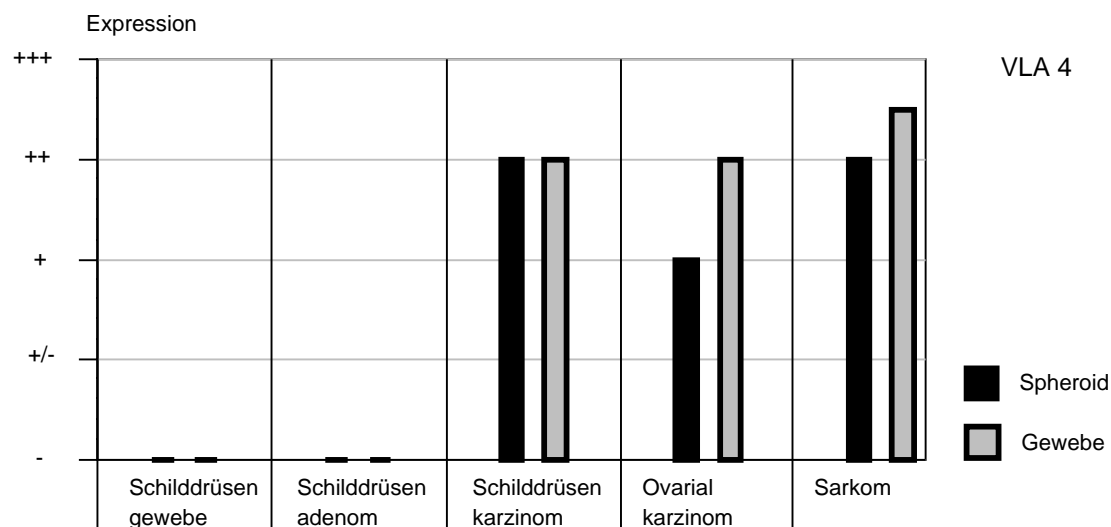


2.7 α_4 -Integrin

Die nichtmalignen Schilddrüsengewebe zeigten keine bzw. nur eine fragliche Expression der α_4 Integrinkette. Ebenso exprimierten die daraus gezüchteten Zellaggregate kein bzw. nur fraglich α_4 Integrin. Die malignen Primärgewebe zeigten dagegen eine positive, zum Teil stark positive Färbereaktion, die auch in den Zellaggregaten nachgewiesen wurde.

Alle statistischen Vergleiche zeigten keinen signifikanten Unterschied in der Expression des α_4 Integrins.

VLA 4		Anzahl						p-Wert
		gesamt	-	+/-	+	++	+++	
Schilddrüsengewebe	Aggregat	18	13	3	1	1		0,6313
	Primär-gewebe	11	9	1			1	
Schilddrüsenadenom	Aggregat	18	13	5				0,6441
	Primär-gewebe	6	4	1	1			
Schilddrüsenkarzinom	Aggregat	9	1		3	3	2	0,715
	Primär-gewebe	1			1			
Ovarialkarzinom	Aggregat	6		2	2	1	1	0,5946
	Primär-gewebe	3		1		1	1	
Sarkom	Aggregat	15		2	4	6	3	0,4658
	Primär-gewebe	4		1		1	2	

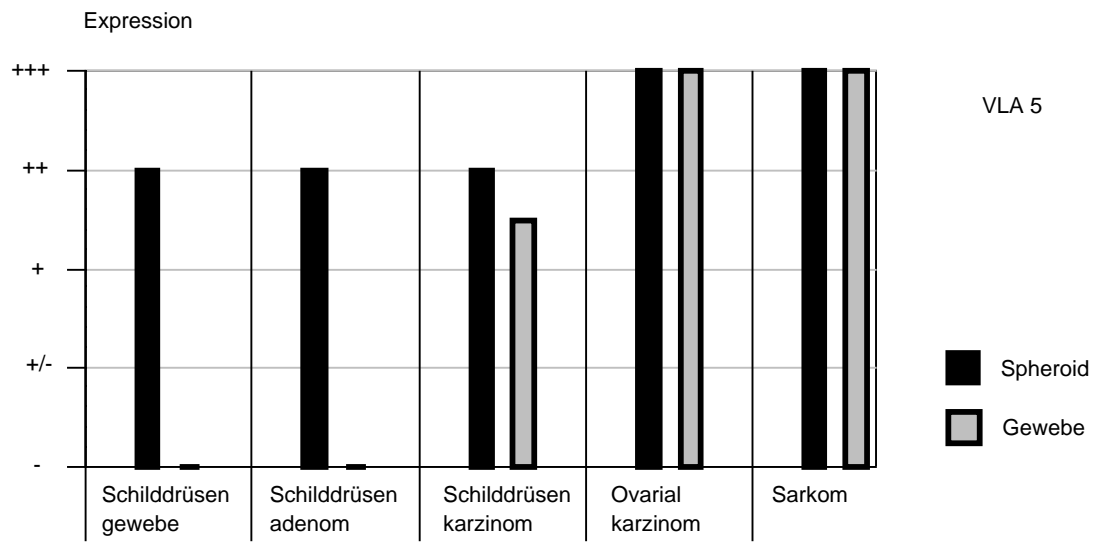


2.8 α_5 -Integrin

Die Analyse der Färbung mit dem Antikörper gegen das α_5 -Integrin ergab ein ähnliches Ergebnis wie bei der α_2 -Integrinfärbung. Die aus nichtmalignen Geweben gezüchteten Zellaggregate waren positiv, während in den Primärgeweben kein α_5 -Integrin nachgewiesen werden konnte. Der statische Vergleich zeigte einen signifikanten Unterschied.

In allen malignen Primärgeweben konnte α_5 -Integrin nachgewiesen werden, daher führte die ebenfalls starke Expression in den Zellaggregaten zu keinem statistisch signifikantem Unterschied.

VLA 5		Anzahl						p-Wert
		gesamt	-	+/-	+	++	+++	
Schilddrüsengewebe	Aggregat	17	1	1	4	9	2	0,0004
	Primär-gewebe	10	7	2		1		
Schilddrüsenadenom	Aggregat	18	2	2	2	9	2	0,0023
	Primär-gewebe	6	4	2				
Schilddrüsenkarzinom	Aggregat	8			2	5	1	0,4551
	Primär-gewebe	2			1	1		
Ovarialkarzinom	Aggregat	7				1	6	0,5127
	Primär-gewebe	3					3	
Sarkom	Aggregat	14			1	4	9	
	Primär-gewebe	5				2	3	

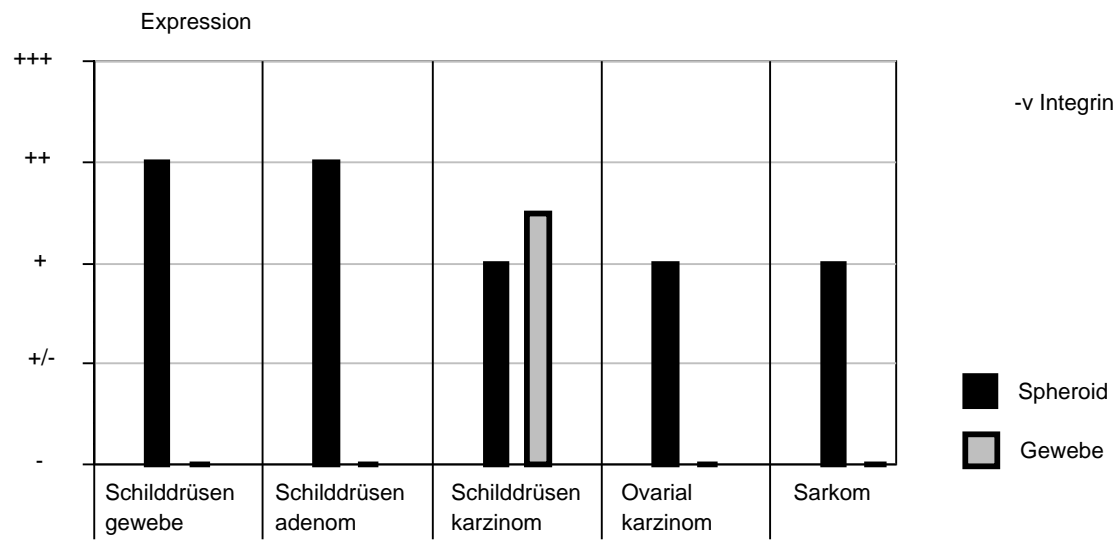


2.9 α_v -Integrin

Auch bei der Färbung mit dem α_v -Integrin wurde ein signifikanter Unterschied bei den nichtmalignen Geweben festgestellt. Die Primärgewebe zeigten eine negative oder nur schwache Expression, die Zellaggregate dagegen eine starke bis sehr starke Expression des α_v -Integrins.

Im Gegensatz zu den α_2 - und α_5 Integrinketten zeigten die malignen Primärgewebe ebenfalls eine nur eine schwache Expression des α_v -Integrins. Die daraus kultivierten Zellaggregate waren deutlich stärker positiv, wenn auch der statistische Vergleich keinen signifikanten Unterschied zeigte.

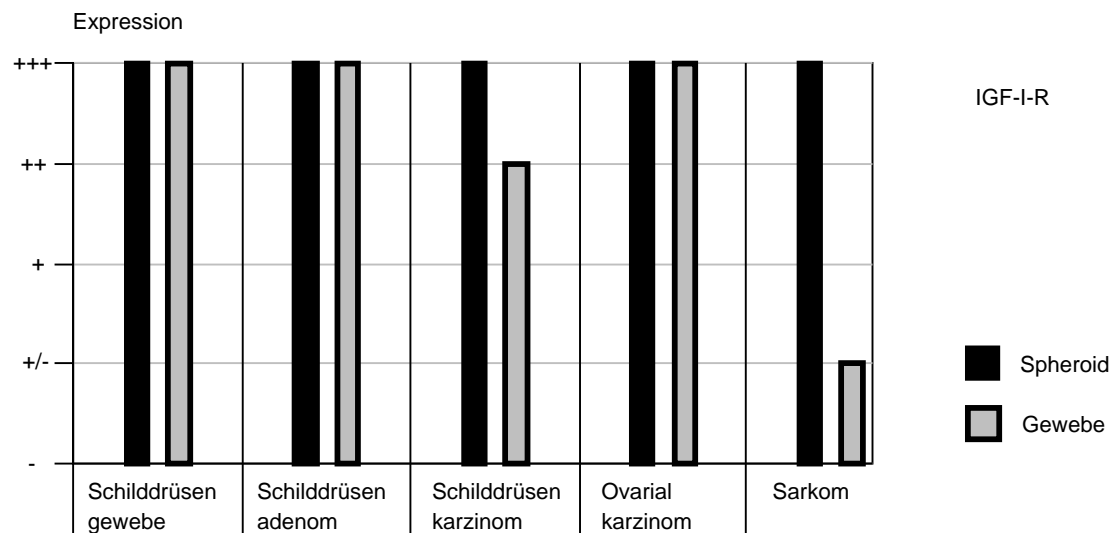
α_v		Anzahl						p-Wert
		gesamt	-	+/-	+	++	+++	
Schilddrüsengewebe	Aggregat	16	1	1	3	4	7	0,0001
	Primärgewebe	11	8	1	2			
Schilddrüsenadenom	Aggregat	15	2		3	6	1	0,0138
	Primärgewebe	11	8	1	2			
Schilddrüsenkarzinom	Aggregat	15	2		3	6	4	0,8627
	Primärgewebe	7	6				1	
Ovarialkarzinom	Aggregat	7	1	1	4	1		0,0616
	Primärgewebe	2	2					
Sarkom	Aggregat	16	4	3	5	3	1	0,1051
	Primärgewebe	4	3		1			



2.10 IGF-I-Rezeptor

Fast durchweg stark positive Färbeergebnisse in allen Primärgeweben und Zellaggregaten lieferte der anti-IGF-I-Rezeptor Antikörper. In keiner Gruppe konnte ein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden.

IGF-I-R		Anzahl						p-Wert
		gesamt	-	+/-	+	++	+++	
Schilddrüsengewebe	Aggregat	18	1		2	1	14	0,8745
	Primär-gewebe	10				3	7	
Schilddrüsenadenom	Aggregat	16		1	1	1	13	0,233
	Primär-gewebe	7					7	
Schilddrüsenkarzinom	Aggregat	8			1	1	6	0,4197
	Primär-gewebe	2			1		1	
Ovarialkarzinom	Aggregat	7			1		6	0,5127
	Primär-gewebe	3					3	
Sarkom	Aggregat	13	2		2	1	8	0,1388
	Primär-gewebe	5	1	2		1	1	



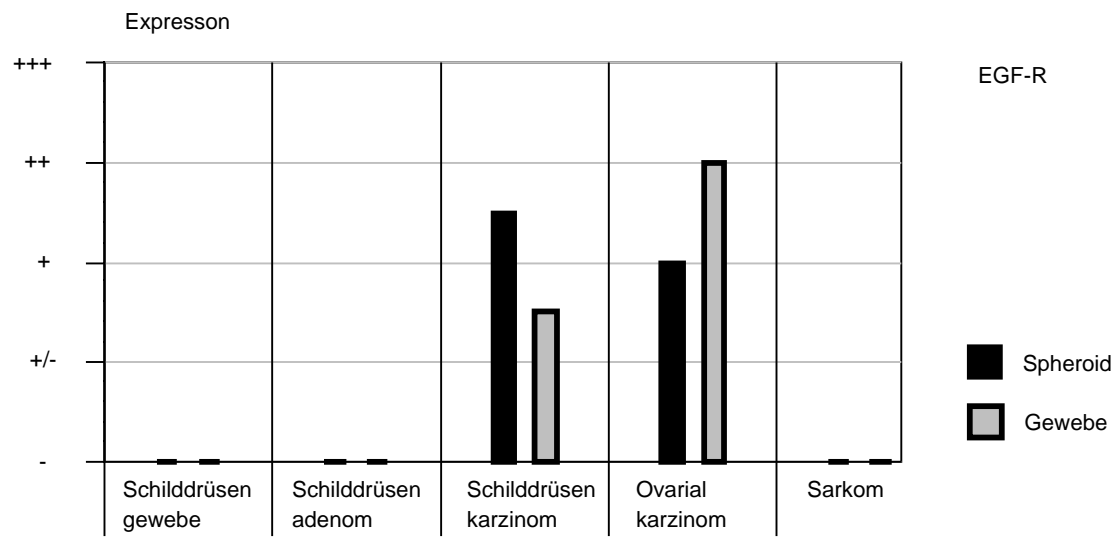
2.11 EGF-Rezeptor

Die nichtmalignen Primärgewebe und die daraus gezüchteten Zellaggregate zeigten eine nur schwache Färbereaktion mit dem anti-EGF-Rezeptor Antikörper.

Die Färbungen mit Karzinomen lieferten stärker positive Ergebnisse, die auch in den Zellaggregaten festgestellt wurden. Die Sarkomprimärgewebe und Sarkomzellaggregate zeigten dagegen nur eine schwache Expression des EGF-Rezeptors.

In keiner Gruppe wurde ein signifikanter Unterschied der Expression festgestellt.

EGF-R		Anzahl						p-Wert
		gesamt	-	+/-	+	++	+++	
Schilddrüsengewebe	Aggregat	18	12	4	1	1		0,358
	Primär-gewebe	11	11					
Schilddrüsenadenom	Aggregat	18	16	2				0,7476
	Primär-gewebe	7	6		1			
Schilddrüsenkarzinom	Aggregat	8	1	2	1	3	1	0,502
	Primär-gewebe	2		1	1			
Ovarialkarzinom	Aggregat	7		2	4		1	0,4733
	Primär-gewebe	3		1		1	1	
Sarkom	Aggregat	13	9	2	2			0,7214
	Primär-gewebe	5	3	1		1		

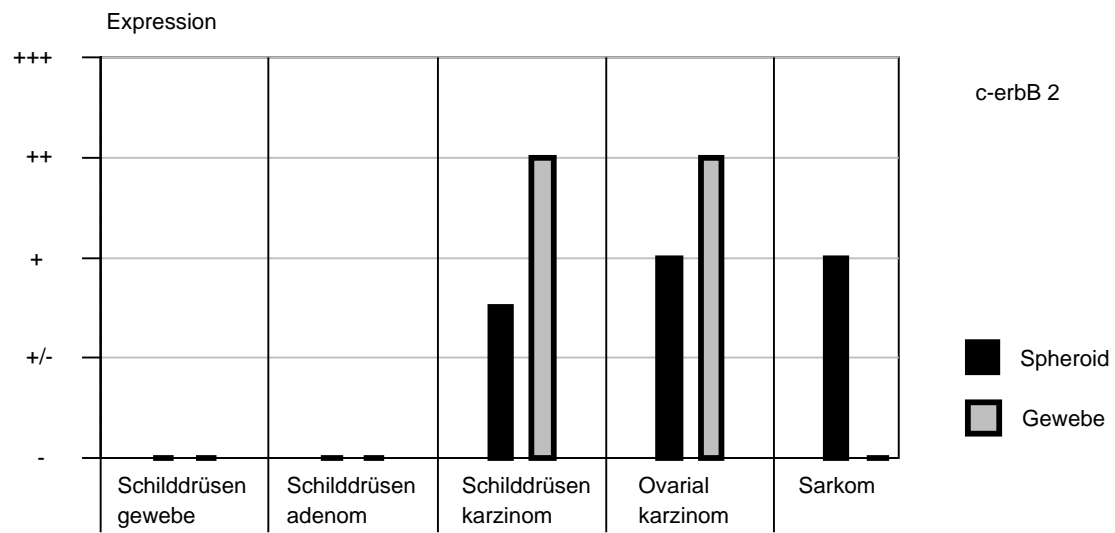


2.12 c-erbB2

c-erbB2 konnte in nichtmalignen Schilddrüsenprimärgewebe und den daraus gewonnenen Zellaggregaten bis auf wenige Ausnahmen nicht nachgewiesen werden. In Schilddrüsenkarzinomen war die Expression in Primärgeweben und Zellaggregaten stärker. In Ovarialkarzinomen und den Ovarialkarzinomzellaggregaten wurden stärker positive Färbungen festgestellt. Sarkomprimärgewebe und deren Zellaggregate zeigten unterschiedliche Expressionen.

In keiner Gruppe wurde ein signifikanter Expressionsunterschied festgestellt.

c-erbB 2		Anzahl						p-Wert
		gesamt	-	+/-	+	++	+++	
Schilddrüsen- ewebe	Aggregat	18	16		2			0,5808
	Primär- gewebe	8	6	1	1			
Schilddrüsen- adenom	Aggregat	18	15			2	1	0,2565
	Primär- gewebe	7	4		1	2		
Schilddrüsen- karzinom	Aggregat	8	3	1	1	3		0,1579
	Primär- gewebe	2				2		
Ovarialkarzin- om	Aggregat	7	2	1	1	2	1	0,415
	Primär- gewebe	3		1		1	1	
Sarkom	Aggregat	13	3	3	3	4		0,052
	Primär- gewebe	5	3	2				



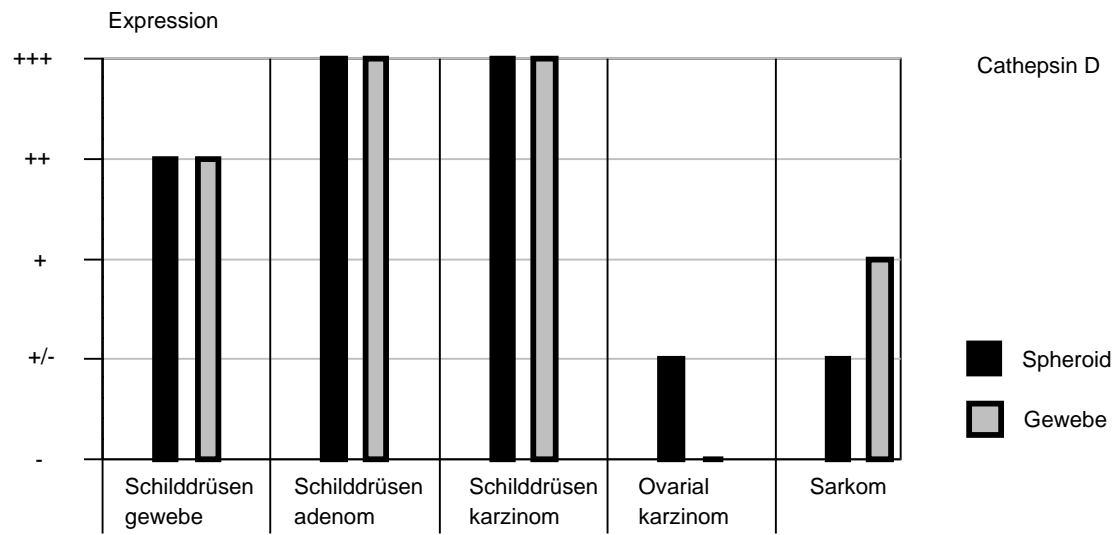
2.13 Cathepsin D

Alle Ovarialkarzinom- und Schilddrüsenprimärgewebe zeigten eine stark positive Expression. Ebenso die daraus gewonnenen Zellaggregate.

Sarkomprimärgewebe zeigten meist positive Färbungen, auch in den daraus gezüchteten Zellaggregaten fanden sich diese Färbungen wieder.

In allen Gruppen wurde kein signifikanter Expressionsunterschied festgestellt.

Cathepsin D		Anzahl						p-Wert
		gesamt	-	+/-	+	++	+++	
Schilddrüsen- ewebe	Aggregat	16		1	2	7	6	0,4362
	Primär- gewebe	9				4	5	
Schilddrüsen- adenom	Aggregat	16		3		3	10	0,4459
	Primär- gewebe	6		1			5	
Schilddrüsen- karzinom	Aggregat	6			2		4	0,3272
	Primär- gewebe	2					2	
Ovarialkarzin- om	Aggregat	7	1	3		2	1	0,0314
	Primär- gewebe	3					3	
Sarkom	Aggregat	14	5	3	6			0,2327
	Primär- gewebe	4	1		2	1		



Diskussion

1 Zellaggregate

Die Nutzung von Trypsin ermöglichte erstmals Moscona [14] die enzymatische Gewebedissoziation. Zu jener Zeit wurden Embryonalzellen in in-vitro Kulturen verwendet, da diese pluripotenten Zellen am ehesten die noch sehr unphysiologischen in-vitro Bedingungen überleben konnten.

Die Reaggregation der dissoziierten Zellen durch Rotieren des Kulturgefäßes ist einerseits abhängig von physikalischen Faktoren wie Temperatur, Scherkräfte und Fliehkräfte bedingt durch die Rotation des Kulturgefäßes, andererseits spielen auch die Konzentration von divalenten Kationen, insbesondere Kalzium, und Kohlenhydraten im Kulturmedium eine Rolle. Besondere Bedeutung bei der Aggregation hat die Zellart und die Anzahl der Zellen im Kulturgefäß. [3]

Mit der in dieser Arbeit verwendeten Anzuchtmethode war es möglich, innerhalb von 1-2 Tagen Zellaggregate aus Tumorfriischgewebe herzustellen. Aus Schilddrüsennormalgewebe konnte bei 90 Prozent aller Ansätze Zellaggregate gewonnen werden, bei allen anderen Gewebearten lag die Erfolgsquote bei 100 Prozent.

Gemessen an dem Kriterium der Beurteilbarkeit immunhistochemischer Färbungen von Gefrierschnitten der Zellaggregate ist die verwendete Methode gut geeignet, Zellaggregate in kurzer Zeit mit einer relativ einfachen Methode herzustellen.

1.1 Die Züchtung der Aggregate

In dieser Arbeit wurde das Verfahren nach Peters [66] bzw. Hoover et al [67] angewandt, die in diesen Arbeiten angewendeten Proteasen und deren Konzentrationen erreichen kurzer Zeit eine optimale Ausbeute und Vitalität der dissoziierten Zellen.

Auch eine andere Arbeit kommt zu ähnlichen Empfehlungen bezüglich der Dissoziationsenzyme und deren Konzentrationen. [70]

Eine 40µm- Gaze filtriert nicht ausschließlich Einzelzellen, auch kleine Zellverbände können bei dieser Größe in das Filtrat gelangen. Wegen der Nachteile einer kleineren Porengröße - längere Filtrierzeiten, während der die Zellen direkt der Luft ausgesetzt sind und schnelles Verstopfen der Poren und dadurch schlechte Ausbeute - wurde diese Porengröße beibehalten.

Der Zellzustand wurde vor der Inkubation kontrolliert, es fanden sich überwiegend Einzelzellen, die größten Zellverbände bestanden aus 4-5 Zellen.

Außerdem war das typischen histologischen Erscheinungsbild des Primärgewebes in den Zellaggregaten nicht mehr vorhanden.

Damit ließ sich ausschließen, daß die Aggregate aufgrund mangelnder Dissoziation oder durch die Gravitation während der Zentrifugation entstanden waren.

2 Immunhistochemie

Der immunhistologische Vergleich von Gewebeschnitten und verhältnismäßig kleinen Zellaggregaten ist mit Problemen behaftet. Bei der Analyse von Gewebeschnitten wird der Objektrand meist nicht berücksichtigt, weil die Antikörper und Färbesubstratlösung selbst durch unspezifische Bindung Artefakte produzieren können. Das Auftreten dieser Artefakte ist von den Gewebeproben, zum Beispiel deren Fettgehalt, und den verwendeten Antikörpern abhängig.

Wegen der geringen Objektgröße mußte die Auswertung der Aggregatfärbungen nach zytologischen Kriterien erfolgen. Außen gelegene Zellen wurden dabei gewertet.

Morphologische Details, wie zum Beispiel nekrotische Zellfelder in Ovarialkarzinomprimärgewebeschnitten konnten beim Vergleich ebenfalls nicht berücksichtigt werden.

3 Die immunhistochemischen Resultate

3.1 Zellzusammensetzung

Für die Untersuchung der Zellzusammensetzung der Zellaggregate ist die Immunhistochemie als nicht quantifizierbare Methode nur bedingt geeignet.

Pro Antikörper wurde ein Gewebeschnitt verwendet und die markierten Zellen im Verhältnis zu den nicht angefärbten Zellen abgeschätzt. Dadurch kann nicht verfolgt werden, ob z.B. eine Nichtepithelzelle ein Leukozyt oder eine Endothelzelle ist.

Andere Verfahren, wie zum Beispiel die Flowcytometrie sind für die Zelltypisierung eventuell besser geeignet.

Dennoch können grundsätzliche Aussagen getroffen werden.

3.2 Epithelzellen

Der HEA 125 Antikörper lieferte hervorragend auswertbare Färbeergebnisse. In den Schilddrüsenprimärgeweben waren sämtliche Thyreozyten positiv, Stromazellen durchweg negativ. In den Zellaggregaten fanden sich zu über 90 % markierte Zellen; die Zellaggregate bestehen somit zu über 90 % aus Epithelzellen. Dies ist insofern beachtlich, da von einer Überwucherung von Fibroblasten in in-vitro Kulturen berichtet wurde [71]

Diese Aussage gilt analog auch für die Ovarialkarzinomzellaggregate.

Sarkomprimärgewebe und die daraus gezüchteten Zellaggregate waren erwartungsgemäß durchweg negativ für diesen Epithelzellmarker.

3.3 Leukozyten

Für die Detektion von Leukozyten wurde ein Antikörper gesucht, der möglichst alle Granulozyten und Lymphozyten mit ihren Klassifikationen erkennt. Der verwendete anti- CD 45 BB Klon erkennt nach Herstellerangaben alle Klassen von Leukozyten, allerdings sind spezifischerer Antikörper sicher besser geeignet, wenn Leukozyten in Zellaggregaten näher untersucht werden sollen. Hier stand das Auftreten von Leukozyten in Zellaggregaten im Vordergrund und darüber können erste Aussagen getroffen werden. In allen Geweben wurden entweder keine oder nur wenige Leukozyten gefunden. In Zellaggregaten war das Auftreten nicht signifikant verschieden. Leukozyten sind in ungefährer Proportion in den gezüchteten Zellaggregaten wiederzufinden.

Für viele Experimente in der Tumorummunologie wäre eine Verwendung von Leukozyten in in-vitro Kulturen, die aus dem selben Organismus wie der Tumor stammen, eine vielversprechende Basis. Die HLA-Antigenität wäre identisch, das immunologische Gedächtnis bliebe erhalten und viele verschiedene Subtypen von Leukozyten, wie zum Beispiel Helfer-, Killer- und Suppressorzellen könnten im Zusammenhang untersucht werden.

Bisher wurden für immunologische Experimente an Zellaggregaten meist Zellen aus einer Zelllinie und Leukozyten aus einer weiteren Zelllinie verwendet [72, 73] Diese Situation ist nur eingeschränkt auf die in vivo Situation übertragbar. Primärzellaggregate, die Leukozyten aus dem Primärgewebe enthalten, wären in diesem Zusammenhang sicherlich ein geeignetes Objekt für ähnliche Experimente in der Tumorummunologie.

3.4 Makrophagen- Histiozyten

Das Auftreten von Makrophagen unterschied sich nur bei den aus Ovarialkarzinomen gezüchteten Zellaggregaten von den Primärgeweben. Es wurde beobachtet, daß Aggregate, die aus makrophagenreichen Primärgeweben kultiviert wurden, auch mehr Makrophagen enthielten.

Die drei untersuchten Primärgewebe der Ovarialkarzinomgruppe zeigten viele nekrotische Bereiche mit vielen positiven Makrophagen. Es ist wahrscheinlich, daß diese nekrotischen Abschnitte bei der Aggregatherstellung eliminiert wurden; Zellen aus diesen Bereichen aggregierten wahrscheinlich nicht zu Zellaggregaten. Daher sind eventuell auch die Makrophagen aus diesen Bereichen nicht in den Zellaggregaten wiederzufinden.

Grundsätzlich finden sich aber auch Makrophagen in organoiden Zellaggregaten ungefähr proportional wieder. Ihr Auftreten kann für weitergehende Experimente genutzt werden.

Makrophagen wurden speziell untersucht, um mögliche falsch positive Färbeergebnisse in Färbungen mit anderen Antikörpern abzuschätzen. Die alkalische Phosphatase in Makrophagen wird nicht immer vollständig durch Levamisole geblockt und ermöglicht unspezifische Farbreaktionen. Der CD 68 Antikörper detektiert die Zellmembran mit kräftiger Rotfärbung, eine intrazelluläre Färbung ist daher verdächtig auf ein falsch positives Färbeergebnis.

Intrazelluläre Färbungen wurden kaum beobachtet, ein falls positiver Fehler durch Makrophagenphosphatase mußte bei der Auswertung nicht berücksichtigt werden.

3.5 Endothelzellen

In Primärgeweben wurden sehr wenige Endothelzellen im immunhistochemischen Präparat gesehen und daher wurden Endothelzellen als negativ oder schwach positiv kategorisiert. Es gibt allerdings keinen plausiblen Grund, daß die Frischgewebe keine Endothelzellen enthalten haben. Daß die Endothelzellen dem Nachweis entgingen, ist wegen einer eindeutigen Positivkontrolle und der positiven Reaktion in den Primäraggregaten schwer erklärbar. Endothelzellen wurden in Plazentagewebe eindeutig markiert Ein

subjektiver Fehler in der Auswertung kann darin liegen, daß vom Erscheinungsbild der Positivkontrolle und der Aggregatfärbungen ausgegangen worden ist, und quantitativ weniger positiv markierten Endothelzellen in Schilddrüsengewebe eine zu niedrige Kategorisierung erhielten.

Die quantitativ viel stärkere Nachweis von CD 31 in den Aggregaten könnte durch das Aggregationsverhalten und die vermehrte Anreicherung von Endothelzellen bedingt sein. Der Antikörper gegen CD 31 weist das platelet endothelial cellular adhesion molecule 1 (PECAM-1) nach. Auch eine vermehrte Expression von CD 31 der Endothelzellen in Primärzellaggregaten könnte den beobachteten Unterschied der Färbeergebnisse erklären.

PECAM-1 ist ein Mitglied der Hyperimmunglobulinfamilie und ist auf Endothelzellen, zirkulierenden Thrombozyten, und weiteren Immunzellen exprimiert [74] und spielt eine Schlüsselrolle bei der Extravasation von Leukozyten. PECAM-1 dient kalziumunabhängig der homophilen und der heterophilen Adhäsion. Dabei scheint PECAM-1 eine wechselseitige Wirkung mit Integrinen einzugehen: eine starke homophile PECAM-1 Bindung steigert die Integrinfunktion, andererseits steigert eine starke Integrinbindung die PECAM-1-Funktion.

Dies kann beispielsweise zur Endothelzellmigration beitragen. [75] Auch in Tumorzellen wurde PECAM-1 nachgewiesen, eine Funktion bei der Adhäsion an Gefäßendothel wird angenommen. [76]

Nach Dissoziation von Endothelzellen konnte PECAM-1 3 Stunden nach Kultivierungsbeginn nachgewiesen werden. Die Aggregation wurden durch Cadherine und PECAM-1 vermittelt. [77]

Sun et al [78] zeigten, daß eine homophile Adhäsion via PECAM-1 über dimere Formen, eine heterophile Adhäsion dagegen über monomeres PECAM-1 gebildet wird. Hohe PECAM-1 Expression ist für eine homophile Aggregation notwendig. Es wurden oft Cluster von Endothelzellen in den Aggregaten beobachtet, bei deren Entstehen PECAM-1 eine Rolle gespielt haben könnte.

3.6 E-Cadherin

Thyreozyten als typische Epithelzellen exprimieren E-Cadherin vor allem in den Zell-Zell kontaktregionen. In Schilddrüsenkarzinomen zeigt sich eine veränderte und reduzierte E-Cadherinexpression. [79, 80] Die E-Cadherinfärbung der Primärgewebe bestätigt die Ergebnisse der Literatur. [24, 81] Im Vergleich mit den Zellaggregaten zeigt sich kein signifikanter Unterschied. Eine Beteiligung von E-Cadherin bei der Aggregatformation gilt als sehr wahrscheinlich. Bei den Schilddrüsenproben waren tendenziell die Aggregate aus Schilddrüsenparenchym und Schilddrüsenadenomen größer als die SchilddrüsenkarzinomAggregate. Dies könnte ein weiterer Beleg für die entscheidende Bedeutung von E-Cadherin bei der Aggregation von dissoziierten Zellen sein.

Auch für Ovarialkarzinome besteht eine inverse Korrelation zwischen Invasivität und E-Cadherinexpression, [82] die mittlere Expression in Primäraggregaten und Primärgeweben ist konform mit dieser Einschätzung.

3.7 Integrine

3.7.1 Vorbemerkung

Für α_2 und α_5 sind bis heute nur die Bindung mit der β_1 -Kette gesichert. Deshalb scheint es gerechtfertigt, die gewonnenen Ergebnisse auf $\alpha_2\beta_1$ bzw. $\alpha_5\beta_1$ zu beziehen. Die Verbindung mit anderen β -Ketten wie zum Beispiel β_7 wird diskutiert, jedoch scheinen die bis jetzt bekannten Verbindungen die weitaus wichtigeren zu sein.

Die α_v -Kette bildet mit mehreren β -Monomeren Integrine, das $\alpha_v\beta_3$ Integrin besitzt dabei herausragende Bedeutung in der Tumorpathologie. In die Diskussion fließen deshalb vor allem Erkenntnisse des $\alpha_v\beta_3$ -Integrins ein.

3.7.2 Analyse der veränderten Integrinexpression

Eine Änderung der Invasionseigenschaften von Schilddrüsenzellen durch eine veränderte α_1 Integrinexpression wurde bereits 1992 beschrieben. [83]. Dahlman et al [84] postulierten, daß in anaplastischen Karzinomen $\alpha_2\beta_1$ stärker exprimiert wird. In der bisher umfassendsten Analyse der Integrinexpression [33] konnten α_2 , α_4 und α_5 Integrinketten, wie auch in dieser Arbeit, in Schilddrüsenparenchym nicht nachgewiesen werden.

In Schilddrüsenadenomen und -tumoren waren alle drei Integrine exprimiert, Schilddrüsenadenome in dieser Arbeit zeigten diese Integrinexpression nicht bzw. nur teilweise.

In einer weiteren Arbeit von Vitale et al. [85] wurden Änderungen der Integrinexpression bei Anzucht von

Schilddrüsenzellen in Monolayern festgestellt. Es wurde ebenfalls eine Expression der α_2 Kette gefunden, gleichzeitig eine Inhibierung der Adhäsion an Fibronectin durch RGD-veränderte Proteine. Die Autoren postulieren, daß die Adhäsion an Fibronectin durch $\alpha_3\beta_1$ vermittelt wird, da $\alpha_5\beta_1$ nicht detektiert werden konnte. Nach Hynes [25] bindet $\alpha_3\beta_1$ an einer anderen Stelle des Integrinmoleküls, insofern kann die gefundene Veränderung der Adhäsion an RGD Bindungsstellen nicht durch $\alpha_3\beta_1$ ermöglicht werden. Dagegen bindet $\alpha_5\beta_1$ über RGD an Fibronectin. Eine Expression dieses Integrins erscheint daher möglich und würde die Adhäsion der Schilddrüsenzellen an Fibronectin besser erklären. In Ovarialkarzinomen sind die alpha Ketten 1; 2; 3; 5; 6 und das β_3 Integrin in vier untersuchten Zelllinien, die α_4 -Kette in zwei von vier Zelllinien gefunden worden [86]

In Sarkomen ist die Integrinexpression von der Tumorart abhängig und deshalb sehr variabel [34, 87] Ein deutlicher Unterschied zeigt sich bei α_2 , α_5 und β_v zwischen der Integrinexpression in Geweben und den daraus gewonnenen Zellaggregaten. Für Schilddrüsenzellen wurde eine de-novo Expression der α_2 -Integrin nach Dispersion durch Kollagenase beschrieben [85] Es wurde geschlußfolgert, daß die Integrinexpression durch Zell-Zell-kontakte beeinflußt wird.

Eine Steuerung der Integrinexpression durch die extrazelluläre Matrix ist bekannt. [88]

Die in dieser Arbeit gefundene de-novo Expression von α_2 , α_5 und β_v -Integrinen kann in ähnlicher Weise als Reaktion auf die Proteasebehandlung zu interpretiert werden.

Wachstum und Differenzierung werden wesentlich durch Zell-Zell-kontakte und Zell-Matrix-Kontakte gesteuert. Durch die Proteasebehandlung wurde die Homöostase der Gewebe aufgehoben bzw. erheblich gestört. Die Wiedererlangung des Kontaktes an die extrazelluläre Matrix müßte daher Ziel dissoziierter Zellen sein. Mit der Expression von $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$ und des β_v Integrins ist ein Erreichen dieses „Zieles“ möglich.

Zwei Aspekte sollen hierbei diskutiert werden, erstens die eigentliche Adhäsion an die Matrix und die darauffolgende Neuorganisation, zweitens das mit diesen Integrinen verbundene Wachstumsverhalten von Zellen.

3.7.3 *Adhäsion und Neoorganisation der Matrix*

Veränderungen und Neoorganisation der extrazellulären Matrix kommen während der Embryonalentwicklung, bei Wundheilungsvorgängen, Invasion und Metastasierungen vor. Ein wesentlicher Bestandteil der extrazellulären Matrix ist Kollagen. Mit der Expression von $\alpha_2\beta_1$ wird die Adhäsion von Epithelzellen [89], einschließlich Schilddrüsenzellen und Ovarialkarzinomzellen [90], Sarkomzellen [91] und Thrombozyten an Kollagen, insbesondere die fibrillären Kollagentypen I, II, III, V und XI ermöglicht.

$\alpha_2\beta_1$ kann die Synthese von Kollagen aktivieren und eine Neuorganisation der Matrix bewirken. [92, 93, 94]

Analog steuert das $\alpha_5\beta_1$ - Integrin Adhäsionsvorgänge und Neoorganisation der Fibronectinmatrix. [95, 96, 97]

β_v -Integrine scheinen keinen Einfluß auf Matrixorganisationen zu haben [98], über diese Integrine können Zellen aber an eine Vielzahl von weiteren Matrixproteinen, unter anderem Vitronectin, Laminin, von Willebrandt Faktor, Sialoprotein, Thrombospondin und auch denaturiertem Kollagen, binden.

3.7.4 *Proliferationsvorteil und Apoptoseschutz*

Zellen, die ihre Verankerung verloren haben und nicht onkogen transformiert sind, treten in Apoptosevorgänge ein. [10] Dieser Mechanismus wird auch als Anoikis bezeichnet. [99] Die Apoptose ist integrin-vermittelt, wird möglicherweise über die focal adhesion kinase intrazellulär gesteuert [100] und kann durch Bindung an „passende“ Matrix oder Wachstumsfaktoren überwunden werden. [101]

Die Wirkung von Integrinen auf die Proliferationsrate ist sehr differenziert und jedes Integrin scheint auf unterschiedliche Zelltypen unterschiedliche Wirkung zu haben. Santala et al [102] postulierten, daß transformationsbedingte Änderungen des Integrinmusters für jeden Zelltyp unterschiedlich und spezifisch sind. Mit der Expression des $\alpha_2\beta_1$ -Integrins erlangen Sarkom- und Melanomzellen eine erhöhte

Proliferations- und Invasionsfähigkeit. [103] Für das Mammakarzinom zeigten Zutter et al [104] eine Abnahme der Proliferation bei Expression des $\alpha_2\beta_1$ Integrins.

Gesichert scheint die Funktion des $\alpha_2\beta_1$ Integrins bei der Migration von metastasierenden Zellen nachdem

sie die Gefäßbarriere überwunden haben. [105]

Das $\alpha_5\beta_1$ -Integrin fungiert als Wachstumssuppressor [106] und schützt Zellen vor Apoptose durch die Aktivierung des Bcl-2. [107] Interessanterweise wird die Wachstumssuppression nach der Bindung an Fibronectin aufgehoben und in einen Proliferationsvorteil umgewandelt. Für die Aggregate wäre diese Art von Konservierung besonders nützlich.

Die Arbeit von Vitale et al. [108] belegt eine Stimulierung der Proliferation von Schilddrüsenzellen, wenn diese an Kollagen oder Fibronectin binden.

Das $\alpha_v\beta_3$ Integrin schützt Melanomzellen und Endothelzellen vor Apoptose durch Suppression der p53 Aktivität, Hemmung der p21WAF1/CIP1 Expression und der Hochregulation von Bcl 2. [109, 110] Daneben kooperiert das $\alpha_v\beta_3$ -Integrin mit cytoplasmatischen Signaltransduktoren für Insulin, IGF-I-R. [111] und PDGF [112] und erhöht so den Wachstumsstimulus auf die Zelle.

Die Angiogenese ist wesentlich von $\alpha_v\beta_3$ abhängig [113]; Endothelzellen adherieren an provisorische Membran via $\alpha_v\beta_3$ und proliferieren dann bis zur Ausbildung eines funktionellen Lumens. [114]

Da in allen Zellaggregaten unabhängig von Dignität oder Herkunft aus dem Keimblatt die Integrine $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$ und $\alpha_v\beta_3$ gegenüber dem Herkunftsgewebe stark de novo exprimiert waren, könnte dies eine Reaktion auf die Proteasebehandlung darstellen. Es ist unwahrscheinlich, daß diese Reaktion nur in vitro zu beobachten ist, da Veränderungen der Homöostase durch Proteasen auch in vivo bei Entzündungen, Verletzungen oder Metastasierungen vorkommen.

3.8 IGF-I-R

Der IGF-I-Rezeptor trägt durch Expressionssteigerung zum malignen Wachstum bei Schilddrüsenkarzinomen [115] und zum neoplastischen Wachstum bei Schilddrüsenadenomen [116] bei. In Ovarialkarzinomen konnte ebenfalls ein Einfluß von IGF via IGF-R auf das Wachstum nachgewiesen werden. [69]

Auch Sarkome exprimieren den IGF-I-Rezeptor. [117, 118] Ohlsson et al [119] beschrieben eine Regulation der Expression des IGF Rezeptors durch p53 in einer Osteosarkomzelllinie.

Die immunhistologische Analyse der Primärgewebe deckt sich mit den Ergebnissen in der Literatur. Die sehr starke Expression in allen Zellaggregaten könnte ein Hinweis für eine spezielle Funktion in der in-vitro Anpassung sein. Für den IGF-I-Rezeptor wurde eine wichtige Funktion bei der Migration von Zellen auf der Vitronectinmatrix via $\alpha_v\beta_3$ -Integrin und via $\alpha_2\beta_1$ auf Kollagenmatrices beschrieben. [120, 121]

3.9 EGF-R

Hölting et al [122] untersuchten den Einfluß von EGF auf Schilddrüsentumorzelllinien, dabei zeigte sich, daß EGF Proliferation, Invasion und Tumorigenität dieser Zellen teilweise drastisch erhöht. Ein Vorkommen des EGF-Rezeptors in Schilddrüsenengewebe und -tumoren ist daher anzunehmen.

Die Expression von EGF-R in Schilddrüsenengewebe und -neoplasien wird in der Literatur kontrovers beschrieben. In Normalgeweben konnte Lemoine et al [123] mit einem polyklonalen Antikörper und Haugen et al [124] mit einem monoklonalen Antikörper immunhistochemisch keine Rezeptoren nachweisen, während andere [125, 126] mit monoklonalen Antikörpern zum Teil stark EGF-R positive Schilddrüsenengewebe fanden.

In Tumoren fanden alle Autoren eine starke Expression, in einer relativ umfangreichen Studie [127, 128] konnte eine Korrelation von zytoplasmatischer Expression von EGF-R und Tumorrekurrenz und damit der Prognose gefunden werden. Bei einer membranöse Expression zeigte sich diese Korrelation nicht.

In Ovarialkarzinomen wurde der EGF-Rezeptor von Bauknecht et al [129, 130, 131, 132] und Foekens et al [133, 134, 135] untersucht.

Die Expression des EGF-Rezeptors in Sarkomen wurde von Gusterson et al., [136] Perosio und Brooks, [137] und Duda et al [138] untersucht; in allen Arbeiten konnte bei ungefähr der Hälfte der Sarkome, vor allem bei epitheloiden und synovialen Sarkomen, nachgewiesen werden. Eine Korrelation zwischen der Expression von EGF-R und Grading, Proliferationsrate bzw. Prognose von Sarkomen scheint nicht zu bestehen.

Die in dieser Arbeit erzielten Färbeargebnisse decken sich wenig mit denen in der Literatur, in Schilddrüsenengewebe und -adenomen, selbst bei Schilddrüsenkarzinomen konnte der EGF-Rezeptor nicht oder nur schwach nachgewiesen werden. Der fehlende Nachweis muß als Fehler der immunhistologischen

Technik interpretiert werden, am wahrscheinlichsten verursacht durch den verwendeten Primärantikörper. Der Clone E30 lieferte in der Positivkontrolle ein überzeugendes Ergebnis und wurde auch in anderen Arbeiten, z.B. bei van der Laan et al [125] verwendet. Da in Ovarialkarzinomen stärkere Färbungen beobachtet wurden, könnte eine niedrige Quantität des Antigens und/oder zu niedrige Sensitivität des E 30 clones zu diesen Ergebnissen geführt haben. Ein anderer Antikörper stand für diese Arbeit nicht zur Verfügung. Die Ursache, des fehlenden Nachweises des EGF-Rezeptors in den meisten Primärgeweben muß daher offenbleiben.

3.10 c-erbB 2

Die Ergebnisse der APAAP-Färbung mit dem polyklonalen Antikörper gegen das c-erbB Onkoprotein zeigte für die Schilddrüsenproben eine relative enge Begrenzung auf neoplastische Gewebe. Damit wäre das c-erbB2 ein Marker für neoplastisches Wachstum.

In anderen Untersuchungen von Soares et al [139] konnten in 16 von 25 untersuchten Schilddrüsennormalgeweben c-erbB 2 immunhistologisch detektiert werden.

Haugen et al. [140] fanden dagegen ausschließlich in Schilddrüsenkarzinomen exprimiertes c-erbB2. Die Bedeutung von c-erbB 2 bei physiologischen bzw. pathologischen Prozessen in der Schilddrüse ist nicht geklärt. Die Bedeutung als prognostischer Faktor bei Schilddrüsenkarzinomen ist gering, eine verstärkte membranöse c-erbB 2 - Expression korreliert mit Entdifferenzierung, aber auch mit weniger Lymphknotenmetastasenbildung. [128]

Die Expression von c-erbB 2 in Ovarialkarzinomen wird von Zhang et al [141] und Bauknecht et al [142] in bis zu einem Drittel aller Karzinome angegeben. Die Expression von c-erbB 2 gilt als wichtiger Prognosefaktor. [143] Besonders das symptomfreie Intervall scheint von der c-erbB 2 Expression abhängig zu sein. [144]

Berns et al [145] dagegen schätzen bei einer Expression des c-erbB 2 in nur 8 % aller Ovarialkarzinome die prognostische Relevanz als weniger bedeutsam ein.

Die Expression in den untersuchten Ovarialkarzinomprimärgeweben ist wie in der Literatur uneinheitlich. Es konnte aber eine vergleichbare Expression bei Zellaggregaten und deren Primärgewebe festgestellt werden. Über die Expression von c-erbB 2 in Sarkomen gibt es wiederum nur wenig Angaben in der Literatur. Wie auch beim EGF-Rezeptor scheint das Vorkommen uneinheitlich und abhängig von jeweiligen Zelltyp zu sein. Im direkten Vergleich der Expression in Zellaggregaten und deren Primärgeweben wurden mit einer Ausnahme einheitliche Expressionen gefunden. Der Vergleich der Expression von c-erbB 2 in Zellaggregaten und deren Primärgewebe ergab in keiner Gewebegruppe einen signifikanten Unterschied. Für die Untersuchung dieses Onkoproteins in vitro sind Aggregate eine geeignete Zellkulturmethode.

3.11 Cathepsin D

Nach Métayé bzw. Kraimps et al [65, 146] korreliert die Expression von Cathepsin D mit dem der Tumorgroße in Schilddrüsenkarzinomen und ist statistisch signifikant erhöht im Vergleich zu den Schilddrüsenngeweben. Cathepsin D dient einerseits der Proteolyse von Thyreoglobulin [147], andererseits spielt es eine Rolle beim invasivem Wachstum des Karzinoms. In den untersuchten Schilddrüsenproben konnte diese Korrelation bestätigt werden. In den Zellaggregaten zeigt sich im Vergleich zu den Primärgeweben kein signifikanter Unterschied.

Cathepsin D gilt als unabhängiger Prognosefaktor für Ovarialkarzinome [148] In den Ovarialkarzinomgeweben und -Zellaggregaten konnte Cathepsin D stark exprimiert nachgewiesen werden. Für die Expression von Cathepsin D in Sarkomen konnte keine entsprechenden Literaturangaben gefunden werden. Die Expression zeigte sich different, wahrscheinlich eine Folge der Zusammenfassung der Sarkomgruppe. Aber auch bei den Sarkomen zeigte sich eine vergleichbare Expression von Zellaggregaten und Primärgewebe.

4 Primär aggregation

Physikalische und molekularbiologische Faktoren beeinflussen die Primärzellaggregation. [149] Die physikalischen Kräfte lassen sich wie folgt zusammenfassen:

Elektrostatische Kräfte zwischen meist negativ geladener Zelloberflächen und negativ geladener Kultursubstratoberfläche, wie zum Beispiel Plastik, Glas etc. Diese Kräfte sind gering und spielen daher eine untergeordnete Rolle. [150]

Van der Waals – Kräfte entstehen durch transiente Änderungen elektrischer Ladung in Zellen,. Dadurch entstehen Anziehungskräfte, die die initiale Adhäsion von Zellen beeinflussen. [151]

Sterische Kräfte werden durch die Sekundär und Tertiärstruktur von Membranproteinen und deren Glykokalix verursacht. Während der Aggregation werden Membranproteine zusammengedrängt, dadurch entstehen Abstoßungskräfte. [149]

Molekulare Mechanismen, die die Primäraggregation in vitro oder auf vermutlich ähnlicher Weise die zelluläre Organisation eines Tumors steuern, sind bis heute noch wenig bekannt.

Es gilt als sicher, daß Cadherine und Integrine eine wesentliche Rolle spielen. Weiterhin scheinen CD 44, Mitglieder der Hyperimmunglobulinfamilie wie CEA und das Clusterin eine Aggregatbildung beeinflussen. In einigen Mammakarzinomzelllinien und der Kolonkarzinomzelllinie HT29 konnten Marshall und Hart et al [35, 152] mit einem das α_5 -Integrin blockierendem Antikörper eine Aggregatbildung erreichen. Mit dem Zusatz eines anti-E-cadherin Antikörpers gelang keine Spheroformation mehr.

In den gezüchteten Zellaggregaten wurde durchgehend eine starke bis sehr starke E-Cadherinexpression gefunden. Die Bedeutung des E-Cadherins bei der Aggregation von Epithelzellen wird durch diese Arbeit bestätigt. Sarkomzellen verhielten sich ähnlich bei der Aggregation wie Epithelzellen, deshalb könnte ein E-Cadherinäquivalent die Aggregatformation steuern.

Die Tatsache, daß in den gezüchteten Zellaggregaten das α_5 -Integrin stark exprimiert gefunden wurde und andererseits nur durch Blockierung des α_5 Integrins eine Aggregatbildung möglich war, impliziert einen Widerspruch. Es ist dabei aber der unterschiedliche Zeitpunkt der Untersuchung zu bedenken: Marshall et al unterbrachen durch die Gabe des α_5 -Integrinantikörpers die Adhäsion der Zellen an die Monolayermatrix, in dieser Arbeit wurden die Zellen durch Proteolyse dissoziiert und die de-novo Expression als eine Reaktion darauf mit dem Ziel der Wiederherstellung einer physiologischen Zell-Matrix-Interaktion interpretiert. Somit scheint die Unterbrechung einer Adhäsion der Zellen an die extrazelluläre Matrix die entscheidende Voraussetzung für eine Aggregatformation zu sein.

Auch Mitglieder der Hyperimmunglobulinfamilie sind wahrscheinlich an der Aggregatformation beteiligt. Für eine Endothel-Endothel-Aggregation sind PECAM-1 Dimere erforderlich. [74] Ob Endothelzellen bei Verlust der Aggregation mit einer gesteigerten Expression von PECAM-1 reagieren, ist noch nicht bekannt.

Zu einem anderen interessanten Ergebnis gelangten Rak et al [153] Eine Aggregatbildung von normalerweise einschichtig wachsenden Darmepithelien gelang nur bei durch ras-oncogen transformierten Zellen. Alle anderen Zellen unterlagen nach 72 Stunden der Apoptose. Die Aggregation von Zellen ist demzufolge zuallererst abhängig von der Zellart und deren Wachstumsverhalten.

5 Schlußbemerkungen

Wachstum und Differenzierung von Zellen werden wesentlich von Zell-Zell-Interaktionen und Zell-Matrix-Interaktionen beeinflusst

In dieser Arbeit wurden Primäraggregate aus Frischgewebe verschiedener Dignität immunhistologisch bezüglich ihrer Zellzusammensetzung und der Expression von Adhäsionsmolekülen, Wachstumsfaktorrezeptoren und einer Protease untersucht.

Es wurde festgestellt, daß Leukozyten und Makrophagen bei der Überführung von Gewebe in Primäraggregate in der in vitro Kultur präsent bleiben und in ungefähr gleicher Verteilung auftreten. Die in vivo Situation wird in den Primäraggregaten vergleichbar wiedergegeben

Die Korrelation der Expression von E-Cadherin, VLA-4, des IGF-I-Rezeptors, des EGF-Rezeptors, c-erbB2 und Cathepsin D unterstreicht die Realitätsnähe der In-vitro Kulturen.

Endothelzellen wurden in manchen Aggregaten häufiger gefunden als in deren Herkunftsgeweben, dies kann durch anderes Aggregationsverhalten oder vermehrte Expression von PECAM-1 bedingt sein.

Die starke Expression der Integrine α_2 , α_5 und der $\alpha_5\beta_1$ -Integrinkette unterschied sich zum Teil statistisch signifikant vom Expressionsmuster in-vivo. Da $\alpha_2\beta_1$ und $\alpha_5\beta_1$ der Adhäsion an die Kollagen-bzw.

Fibronectinmatrix dienen und eine nachfolgende Neorganisation ermöglichen und $\alpha_5\beta_1$ die Adhäsion an fast alle anderen Bestandteile der extrazellulären Matrix ermöglicht, scheint die Wiedererlangung einer Zell-Matrix-Interaktion ein Ziel dissoziierter Zellen zu sein. Die Wiedererlangung von Zell-Matrix-Interaktionen unterdrückt den Prozeß der integrinvermittelten Apoptose und stimuliert darüberhinaus die Proliferation von Zellen. Die de-novo Expression der Integrine wird deshalb als geregelte Reaktion auf die in-vitro Situation aufgefaßt.

Literatur

- [1] Carrel, A. (1912): On the permanent life of tissue outside the organism, *J. Exp. Med.* (Band 15), Seite 516-528.
- [2] Acker, H. Helmut (1984): Spheroids in cancer research : methods and perspectives /, Springer-Verlag,, Berlin ; New York :.
- [3] Steinsvaag, S. K. und Bjerknes, R. (1992): Spheroids of normal tissue in culture, Bjerkvig, Rolf, Spheroid culture in cancer research /, CRC Press,, Boca Raton, Fla. :.
- [4] Kerbel, R. S.; Rak, J.; Kobayashi, H.; Man, M. S.; St Croix, B. und Graham, C. H. (1994): Multicellular resistance: a new paradigm to explain aspects of acquired drug resistance of solid tumors, *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* (Band 59), Seite 661-72.
- [5] Hoffman, R. M. (1993): To do tissue culture in two or three dimensions? That is the question, *Stem Cells Dayt* (Band 11), Nr. 2, Seite 105-11.
- [6] Walenta, S.; Doetsch, J.; Mueller-Klieser, W. und Kunz-Schughart, L (2000): Metabolic Imaging in Multicellular Spheroids of oncogene-transfected Fibroblasts, *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* (Band 48), Nr. 4, Seite 509-522.
- [7] Kallinowski, F.; Tyler, G.; Mueller-Klieser, W. und Vaupel, P. (1989): Growth-related changes of oxygen consumption rates of tumor cells grown in vitro and in vivo, *J Cell Physiol* (Band 138), Nr. 1, Seite 183-91.
- [8] Waleh, N. S.; Gallo, J.; Grant, T. D.; Murphy, B. J.; Kramer, R. H. und Sutherland, R. M. (1994): Selective down-regulation of integrin receptors in spheroids of squamous cell carcinoma, *Cancer Research* (Band 54), Nr. 3, Seite 838-43.
- [9] Theodorescu, D; Sheehan, C und Kerbel, R S (1993): TGF-beta gene expression depends on tissue architecture, *In Vitro Cell Dev Biol* (Band 29A), Nr. 2, Seite 105-108.
- [10] Ruoslahti, E. und Reed, J. C. (1994): Anchorage dependence, integrins, and apoptosis, *Cell* (Band 77), Nr. 4, Seite 477-8.
- [11] Fujita, N.; Kataoka, S.; Naito, M.; Heike, Y.; Boku, N.; Nakajima, M. und Tsuruo, T. (1993): Suppression of T-lymphoma cell apoptosis by monoclonal antibodies raised against cell surface adhesion molecules, *Cancer Res* (Band 53), Nr. 20, Seite 5022-7.
- [12] Steeg, P. S.; Alley, M. C. und Grever, M. R. (1994): An added dimension: will three-dimensional cultures improve our understanding of drug resistance? [editorial; comment] [see comments], *Journal of the National Cancer Institute* (Band 86), Nr. 13, Seite 953-5.
- [13] Graham, C. H.; Kobayashi, H.; Stankiewicz, K. S.; Man, S.; Kapitan, S. J. und Kerbel, R. S. (1994): Rapid acquisition of multicellular drug resistance after a single exposure of mammary tumor cells to antitumor alkylating agents [see comments], *Journal of the National Cancer Institute* (Band 86), Nr. 13, Seite 975-82.
- [14] Moscona, A. (1961): Rotation-mediated histogenetic aggregation of dissociated cells, *Exp. cell res* (Band 22), Seite 455-475.
- [15] Koller, M. R. und Papoutsakis, E. T. (1995): Cell adhesion in animal cell culture: physiological and fluid- mechanical implications, *Bioprocess Technol* (Band 20), Seite 61-110. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=0007765637>
- [16] Takeichi, M. (1991): Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator, *Science* (Band 251), Nr. 5000, Seite 1451-5.
- [17] Birchmeier, W. und Behrens, J. (1994): Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness, *Biochim Biophys Acta* (Band 1198), Nr. 1, Seite 11-26.
- [18] Patel, D. J. und Gumbiner, B. M. (1995): Cell-cell recognition. Zipping together a cell adhesion interface [news; comment], *Nature* (Band 374), Nr. 6520, Seite 306-7.

- [19] Takeichi, M. (1995): Morphogenetic roles of classic cadherins, *Current Opinion in Cell Biology* (Band 7), Nr. 5, Seite 619-27.
- [20] Kemler, R. (1992): Classical cadherins, *Seminars in Cell Biology* (Band 3), Nr. 3, Seite 149-55.
- [21] Behrens, J.; Mareel, M. M.; Van Roy, F. M. und Birchmeier, W. (1989): Dissecting tumor cell invasion: epithelial cells acquire invasive properties after the loss of uvomorulin-mediated cell-cell adhesion, *Journal of Cell Biology* (Band 108), Nr. 6, Seite 2435-47.
- [22] Vleminckx, K. L.; Deman, J. J.; Bruyneel, E. A.; Vandenbossche, G. M.; Keirsebilck, A. A.; Mareel, M. M. und van Roy, F. M. (1994): Enlarged cell-associated proteoglycans abolish E-cadherin functionality in invasive tumor cells, *Cancer Research* (Band 54), Nr. 4, Seite 873-7.
- [23] Kadowaki, T.; Shiozaki, H.; Inoue, M.; Tamura, S.; Oka, H.; Doki, Y.; Iihara, K.; Matsui, S.; Iwazawa, T.; Nagafuchi, A. und et al. (1994): E-cadherin and alpha-catenin expression in human esophageal cancer, *Cancer Research* (Band 54), Nr. 1, Seite 291-6.
- [24] von Wasielewski, R.; Rhein, A.; Werner, M.; Scheumann, G. F.; Dralle, H.; Peotter, E.; Brabant, G. und Georgii, A. (1997): Immunohistochemical detection of E-cadherin in differentiated thyroid carcinomas correlates with clinical outcome, *Cancer Research* (Band 57), Nr. 12, Seite 2501-7.
- [25] Hynes, R. O. (1992): Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion, *Cell* (Band 69), Nr. 1, Seite 11-25.
- [26] Yurochko, A. D.; Liu, D. Y.; Eierman, D. und Haskill, S. (1992): Integrins as a primary signal transduction molecule regulating monocyte immediate-early gene induction, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (Band 89), Nr. 19, Seite 9034-8.
- [27] Aota, S. und Yamada, K. M. (1995): Fibronectin and cell adhesion: specificity of integrin-ligand interaction, *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology* (Band 70), Seite 1-21.
- [28] Mould, R. F. (1995): The early history of x-ray diagnosis with emphasis on the contributions of physics 1895-1915, *Physics in Medicine and Biology* (Band 40), Nr. 11, Seite 1741-87.
- [29] Clark, E. A. und Brugge, J. S. (1995): Integrins and signal transduction pathways: the road taken, *Science* (Band 268), Nr. 5208, Seite 233-9.
- [30] Giancotti, F. G. (1997): Integrin signaling: specificity and, *Curr Opin Cell Biol* (Band 9), Nr. 5, Seite 691-700.
- [31] Ruoslahti, E. (1992): The Walter Herbert Lecture. Control of cell motility and tumour invasion by extracellular matrix interactions, *British Journal of Cancer* (Band 66), Nr. 2, Seite 239-42.
- [32] Varner, J. A. und Cheresch, D. A. (1996): Integrins and cancer, *Current Opinion in Cell Biology* (Band 8), Nr. 5, Seite 724-30.
- [33] Vitale, M.; Bassi, V.; Illario, M.; Fenzi, G.; Casamassima, A. und Rossi, G. (1994): Loss of polarity and de novo expression of the beta 1 family of integrins in thyroid tumors, *International Journal of Cancer* (Band 59), Nr. 2, Seite 185-90.
- [34] Mattila, P.; Majuri, M. L. und Renkonen, R. (1992): VLA-4 integrin on sarcoma cell lines recognizes endothelial VCAM-1. Differential regulation of the VLA-4 avidity on various sarcoma cell lines, *International Journal of Cancer* (Band 52), Nr. 6, Seite 918-23.
- [35] Marshall, J. F. und Hart, I. R. (1996): The role of alpha v-integrins in tumour progression and metastasis, *Seminars in Cancer Biology* (Band 7), Nr. 3, Seite 129-38.
- [36] Seedorf, K. (1995): Intracellular signaling by growth factors, *Metabolism: Clinical and Experimental* (Band 44), Nr. 10 Suppl 4, Seite 24-32.
- [37] Schlessinger, J. (1993): How receptor tyrosine kinases activate Ras, *Trends in Biochemical Sciences* (Band 18), Nr. 8, Seite 273-5.
- [38] Schlessinger, J. und Bar-Sagi, D. (1994): Activation of Ras and other signaling pathways by receptor tyrosine kinases, *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* (Band 59), Seite 173-9.

- [39] Baserga, R. (1995): The insulin-like growth factor I receptor: a key to tumor growth?, *Cancer Research* (Band 55), Nr. 2, Seite 249-52.
- [40] Sell, C.; Rubini, M.; Rubin, R.; Liu, J. P.; Efstratiadis, A. und Baserga, R. (1993): Simian virus 40 large tumor antigen is unable to transform mouse embryonic fibroblasts lacking type 1 insulin-like growth factor receptor, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (Band 90), Nr. 23, Seite 11217-21.
- [41] Sell, C.; Dumenil, G.; Deveaud, C.; Miura, M.; Coppola, D.; DeAngelis, T.; Rubin, R.; Efstratiadis, A. und Baserga, R. (1994): Effect of a null mutation of the insulin-like growth factor I receptor gene on growth and transformation of mouse embryo fibroblasts, *Molecular and Cellular Biology* (Band 14), Nr. 6, Seite 3604-12.
- [42] Morriane, A.; DeAngelis, T. und Baserga, R. (1995): Failure of the bovine papillomavirus to transform mouse embryo fibroblasts with a targeted disruption of the insulin-like growth factor I receptor genes, *Journal of Virology* (Band 69), Nr. 9, Seite 5300-3.
- [43] Steller, M. A.; Zou, Z.; Schiller, J. T. und Baserga, R. (1996): Transformation by human papillomavirus 16 E6 and E7: role of the insulin-like growth factor 1 receptor, *Cancer Research* (Band 56), Nr. 21, Seite 5087-91.
- [44] Toretsky, J. A.; Kalebic, T.; Blakesley, V.; LeRoith, D. und Helman, L. J. (1997): The insulin-like growth factor-I receptor is required for EWS/FLI-1 transformation of fibroblasts, *Journal of Biological Chemistry* (Band 272), Nr. 49, Seite 30822-7.
- [45] Coppola, D.; Ferber, A.; Miura, M.; Sell, C.; D'Ambrosio, C.; Rubin, R. und Baserga, R. (1994): A functional insulin-like growth factor I receptor is required for the mitogenic and transforming activities of the epidermal growth factor receptor, *Molecular and Cellular Biology* (Band 14), Nr. 7, Seite 4588-95.
- [46] DeAngelis, T.; Ferber, A. und Baserga, R. (1995): Insulin-like growth factor I receptor is required for the mitogenic and transforming activities of the platelet-derived growth factor receptor, *Journal of Cellular Physiology* (Band 164), Nr. 1, Seite 214-21.
- [47] Miura, M.; Surmacz, E.; Burgaud, J. L. und Baserga, R. (1995): Different effects on mitogenesis and transformation of a mutation at tyrosine 1251 of the insulin-like growth factor I receptor, *Journal of Biological Chemistry* (Band 270), Nr. 38, Seite 22639-44.
- [48] Evan, G. I.; Wyllie, A. H.; Gilbert, C. S.; Littlewood, T. D.; Land, H.; Brooks, M.; Waters, C. M.; Penn, L. Z. und Hancock, D. C. (1992): Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein, *Cell* (Band 69), Nr. 1, Seite 119-28.
- [49] Earp, H. S.; Dawson, T. L.; Li, X. und Yu, H. (1995): Heterodimerization and functional interaction between EGF receptor family members: a new signaling paradigm with implications for breast cancer research, *Breast Cancer Research and Treatment* (Band 35), Nr. 1, Seite 115-32.
- [50] Qian, X.; LeVea, C. M.; Freeman, J. K.; Dougall, W. C. und Greene, M. I. (1994): Heterodimerization of epidermal growth factor receptor and wild-type or kinase-deficient Neu: a mechanism of interreceptor kinase activation and transphosphorylation, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (Band 91), Nr. 4, Seite 1500-4.
- [51] Peles, E. und Yarden, Y. (1993): Neu and its ligands: from an oncogene to neural factors, *Bioessays* (Band 15), Nr. 12, Seite 815-24.
- [52] Wiley, L. M.; Adamson, E. D. und Tsark, E. C. (1995): Epidermal growth factor receptor function in early mammalian development, *Bioessays* (Band 17), Nr. 10, Seite 839-46.
- [53] Clark, A. J.; Ishii, S.; Richert, N.; Merlino, G. T. und Pastan, I. (1985): Epidermal growth factor regulates the expression of its own receptor, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (Band 82), Nr. 24, Seite 8374-8.
- [54] Slamon, D. J.; Clark, G. M.; Wong, S. G.; Levin, W. J.; Ullrich, A. und McGuire, W. L. (1987): Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene, *Science* (Band 235), Nr. 4785, Seite 177-82.

- [55] Brandt, B.; Vogt, U.; Schlotter, C. M.; Jackisch, C.; Werkmeister, R.; Thomas, M.; von Eiff, M.; Bosse, U.; Assmann, G. und Zeanker, K. S. (1995): Prognostic relevance of aberrations in the erbB oncogenes from breast, ovarian, oral and lung cancers: double-differential polymerase chain reaction ddPCR for clinical diagnosis, *Gene* (Band 159), Nr. 1, Seite 35-42.
- [56] Keshgegian, A. A. (1995): ErbB-2 oncoprotein overexpression in breast carcinoma: inverse correlation with biochemically- and immunohistochemically-determined hormone receptors, *Breast Cancer Research and Treatment* (Band 35), Nr. 2, Seite 201-10.
- [57] Lang, T.; Daxenbichler, G. und Marth, C. (1994): Effects of cytostatic agents on the expression of epidermal growth factor receptor in ovarian cancer cells, *Anticancer Research* (Band 14), Nr. 5A, Seite 1871-4.
- [58] Lupu, R.; Cardillo, M.; Harris, L.; Hijazi, M. und Rosenberg, K. (1995): Interaction between erbB-receptors and heregulin in breast cancer tumor progression and drug resistance, *Seminars in Cancer Biology* (Band 6), Nr. 3, Seite 135-45.
- [59] Duffy, M. J. (1987): Do proteases play a role in cancer invasion and metastasis?, *European Journal of Cancer and Clinical Oncology* (Band 23), Nr. 5, Seite 583-9.
- [60] Monsky, W. L. und Chen, W. T. (1993): Proteases of cell adhesion proteins in cancer [see comments], *Seminars in Cancer Biology* (Band 4), Nr. 4, Seite 251-8.
- [61] Liaudet, E.; Derocq, D.; Rochefort, H. und Garcia, M. (1995): Transfected cathepsin D stimulates high density cancer cell growth by inactivating secreted growth inhibitors, *Cell Growth and Differentiation* (Band 6), Nr. 9, Seite 1045-52.
- [62] Morgan, D. O.; Edman, J. C.; Standring, D. N.; Fried, V. A.; Smith, M. C.; Roth, R. A. und Rutter, W. J. (1987): Insulin-like growth factor II receptor as a multifunctional binding protein [published erratum appears in *Nature* 1988 Jul;20 7 :442], *Nature* (Band 329), Nr. 6137, Seite 301-7.
- [63] Hähnel, R.; Harvey, J.; Robbins, P. und Sterrett, G. (1993): Cathepsin-D in human breast cancer: correlation with vascular invasion and other clinical and histopathological characteristics, *Anticancer Research* (Band 13), Nr. 6A, Seite 2131-5.
- [64] Nazeer, T.; Malfetano, J. H.; Rosano, T. G. und Ross, J. S. (1992): Correlation of tumor cytosol cathepsin D with differentiation and invasiveness of endometrial adenocarcinoma, *American Journal of Clinical Pathology* (Band 97), Nr. 6, Seite 764-9.
- [65] Métayé, T.; Millet, C.; Kraimps, J. L.; Aubouin, B.; Barbier, J. und Baegon, F. (1993): Estrogen receptors and cathepsin D in human thyroid tissue, *Cancer* (Band 72), Nr. 6, Seite 1991-6.
- [66] Peters, L. C.; Brandhorst, J. S. und Hanna, M. G., Jr. (1979): Preparation of immunotherapeutic autologous tumor cell vaccines from solid tumors, *Cancer Research* (Band 39), Nr. 4, Seite 1353-60.
- [67] Hoover, H. C., Jr.; Surdyke, M.; Dangel, R. B.; Peters, L. C. und Hanna, M. G., Jr. (1984): Delayed cutaneous hypersensitivity to autologous tumor cells in colorectal cancer patients immunized with an autologous tumor cell: Bacillus Calmette-Guérin vaccine, *Cancer Research* (Band 44), Nr. 4, Seite 1671-6.
- [68] Cordell, J. L.; Falini, B.; Erber, W. N.; Ghosh, A. K.; Abdulaziz, Z.; MacDonald, S.; Pulford, K. A.; Stein, H. und Mason, D. Y. (1984): Immunoenzymatic labeling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase APAAP complexes, *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* (Band 32), Nr. 2, Seite 219-29.
- [69] Weigang, B.; Nap, M.; Bittl, A. und Jaeger, W. (1994): Immunohistochemical localization of insulin-like growth factor 1 receptors in benign and malignant tissues of the female genital tract, *Tumour Biology* (Band 15), Nr. 4, Seite 236-46.
- [70] Fröhlich, E.; Wahl, R. und Reutter, K. (1995): Efficiency of various dissociation methods for the preparation of thyroid single cell suspensions, *Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes* (Band 103), Nr. 5, Seite 308-16.
- [71] Knüchel, R. und Hofstädter, F. (1994): In-vitro Kultur: vom Gewebe zur Zelllinie, *Pathologe* (Band 15), Nr. 3, Seite 141-9.

- [72] Konur, A.; Kreutz, M.; Kneuchel, R.; Krause, S. W. und Andreessen, R. (1996): Three-dimensional co-culture of human monocytes and macrophages with tumor cells: analysis of macrophage differentiation and activation, *International Journal of Cancer* (Band 66), Nr. 5, Seite 645-52.
- [73] Audran, R.; Dazord, L. und Toujas, L. (1994): Interactions between human macrophages and tumor cells in three-dimensional cultures, *Cancer Immunology, Immunotherapy* (Band 39), Nr. 5, Seite 299-304.
- [74] Newman, P. J. (1997): The biology of PECAM-1, *Journal of Clinical Investigation* (Band 100), Nr. 11 Suppl, Seite S25-9.
- [75] Lu, T. T.; Yan, L. G. und Madri, J. A. (1996): Integrin engagement mediates tyrosine dephosphorylation on platelet-endothelial cell adhesion molecule 1, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (Band 93), Nr. 21, Seite 11808-13.
- [76] Tang, D. G.; Chen, Y. Q.; Newman, P. J.; Shi, L.; Gao, X.; Diglio, C. A. und Honn, K. V. (1993): Identification of PECAM-1 in solid tumor cells and its potential involvement in tumor cell adhesion to endothelium, *Journal of Biological Chemistry* (Band 268), Nr. 30, Seite 22883-94.
- [77] Ayalon, O.; Sabanai, H.; Lampugnani, M. G.; Dejana, E. und Geiger, B. (1994): Spatial and temporal relationships between cadherins and PECAM-1 in cell-cell junctions of human endothelial cells, *Journal of Cell Biology* (Band 126), Nr. 1, Seite 247-58.
- [78] Sun, J.; Williams, J.; Yan, H. C.; Amin, K. M.; Albelda, S. M. und DeLisser, H. M. (1996): Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 PECAM-1 homophilic adhesion is mediated by immunoglobulin-like domains 1 and 2 and depends on the cytoplasmic domain and the level of surface expression, *Journal of Biological Chemistry* (Band 271), Nr. 31, Seite 18561-70.
- [79] Brabant, G.; Hoang-Vu, C.; Cetin, Y.; Dralle, H.; Scheumann, G.; Meolne, J.; Hansson, G.; Jansson, S.; Ericson, L. E. und Nilsson, M. (1993): E-cadherin: a differentiation marker in thyroid malignancies, *Cancer Research* (Band 53), Nr. 20, Seite 4987-93.
- [80] Serini, G.; Trusolino, L.; Saggiorato, E.; Cremona, O.; De Rossi, M.; Angeli, A.; Orlandi, F. und Marchisio, P. C. (1996): Changes in integrin and E-cadherin expression in neoplastic versus normal thyroid tissue, *Journal of the National Cancer Institute* (Band 88), Nr. 7, Seite 442-9.
- [81] Scheumann, G. F.; Hoang-Vu, C.; Cetin, Y.; Gimm, O.; Behrends, J.; von Wasielewski, R.; Georgii, A.; Birchmeier, W.; von Zur Meuhlen, A.; Dralle, H. und et al. (1995): Clinical significance of E-cadherin as a prognostic marker in thyroid carcinomas, *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* (Band 80), Nr. 7, Seite 2168-72.
- [82] Veatch, A. L.; Carson, L. F. und Ramakrishnan, S. (1994): Differential expression of the cell-cell adhesion molecule E-cadherin in ascites and solid human ovarian tumor cells, *International Journal of Cancer* (Band 58), Nr. 3, Seite 393-9.
- [83] Demeure, M. J.; Damsky, C. H.; Elfman, F.; Goretzki, P. E.; Wong, M. G. und Clark, O. H. (1992): Invasion by cultured human follicular thyroid cancer correlates with increased beta 1 integrins and production of proteases, *World Journal of Surgery* (Band 16), Nr. 4, Seite 770-6.
- [84] Dahlman, T.; Grimelius, L.; Wallin, G.; Rubin, K. und Westermarck, K. (1998): Integrins in thyroid tissue: upregulation of alpha2beta1 in anaplastic thyroid carcinoma, *European Journal of Endocrinology* (Band 138), Nr. 1, Seite 104-12.
- [85] Vitale, M.; Casamassima, A.; Illario, M.; Bassi, V.; Fenzi, G. und Rossi, G. (1995): Cell-to-cell contact modulates the expression of the beta 1 family of integrins in primary cultures of thyroid cells, *Experimental Cell Research* (Band 220), Nr. 1, Seite 124-9.
- [86] Cannistra, S. A.; Ottensmeier, C.; Niloff, J.; Orta, B. und DiCarlo, J. (1995): Expression and function of beta 1 and alpha v beta 3 integrins in ovarian cancer, *Gynecologic Oncology* (Band 58), Nr. 2, Seite 216-25.
- [87] Barth, T.; Meoller, P. und Mechttersheimer, G. (1995): Differential expression of beta 1, beta 3 and beta 4 integrins in sarcomas of the small, round, blue cell category, *Virchows Archiv* (Band 426), Nr. 1, Seite 19-25.

- [88] Delcommenne, M. und Streuli, C. H. (1995): Control of integrin expression by extracellular matrix, *Journal of Biological Chemistry* (Band 270), Nr. 45, Seite 26794-801.
- [89] Zutter, M. M. und Santoro, S. A. (1990): Widespread histologic distribution of the alpha 2 beta 1 integrin cell- surface collagen receptor, *Am J Pathol* (Band 137), Nr. 1, Seite 113-20.
- [90] Moser, T. L.; Young, T. N.; Rodriguez, G. C.; Pizzo, S. V.; Bast, R. C., Jr. und Stack, M. S. (1994): Secretion of extracellular matrix-degrading proteinases is increased in epithelial ovarian carcinoma, *International Journal of Cancer* (Band 56), Nr. 4, Seite 552-9.
- [91] Vihinen, P.; Riikonen, T.; Laine, A. und Heino, J. (1996): Integrin alpha 2 beta 1 in tumorigenic human osteosarcoma cell lines regulates cell adhesion, migration, and invasion by interaction with type I collagen, *Cell Growth and Differentiation* (Band 7), Nr. 4, Seite 439-47.
- [92] Schiro, J. A.; Chan, B. M.; Roswit, W. T.; Kassner, P. D.; Pentland, A. P.; Hemler, M. E.; Eisen, A. Z. und Kupper, T. S. (1991): Integrin alpha 2 beta 1 VLA-2 mediates reorganization and contraction of collagen matrices by human cells, *Cell* (Band 67), Nr. 2, Seite 403-10.
- [93] Klein, C. E.; Dressel, D.; Steinmayer, T.; Mauch, C.; Eckes, B.; Krieg, T.; Bankert, R. B. und Weber, L. (1991): Integrin alpha 2 beta 1 is upregulated in fibroblasts and highly aggressive melanoma cells in three-dimensional collagen lattices and mediates the reorganization of collagen I fibrils, *Journal of Cell Biology* (Band 115), Nr. 5, Seite 1427-36.
- [94] Langholz, O.; Reockel, D.; Mauch, C.; Kozłowska, E.; Bank, I.; Krieg, T. und Eckes, B. (1995): Collagen and collagenase gene expression in three-dimensional collagen lattices are differentially regulated by alpha 1 beta 1 and alpha 2 beta 1 integrins, *Journal of Cell Biology* (Band 131), Nr. 6 Pt 2, Seite 1903-15.
- [95] Wu, C.; Bauer, J. S.; Juliano, R. L. und McDonald, J. A. (1993): The alpha 5 beta 1 integrin fibronectin receptor, but not the alpha 5 cytoplasmic domain, functions in an early and essential step in fibronectin matrix assembly, *Journal of Biological Chemistry* (Band 268), Nr. 29, Seite 21883-8.
- [96] Huhtala, P.; Humphries, M. J.; McCarthy, J. B.; Tremble, P. M.; Werb, Z. und Damsky, C. H. (1995): Cooperative signaling by alpha 5 beta 1 and alpha 4 beta 1 integrins regulates metalloproteinase gene expression in fibroblasts adhering to fibronectin, *Journal of Cell Biology* (Band 129), Nr. 3, Seite 867-79.
- [97] Hocking, D. C.; Smith, R. K. und McKeown-Longo, P. J. (1996): A novel role for the integrin-binding III-10 module in fibronectin matrix assembly, *Journal of Cell Biology* (Band 133), Nr. 2, Seite 431-44.
- [98] Frisch, S. M.; Vuori, K.; Ruoslahti, E. und Chan-Hui, P. Y. (1996): Control of adhesion-dependent cell survival by focal adhesion kinase, *Journal of Cell Biology* (Band 134), Nr. 3, Seite 793-9.
- [99] Frisch, S. M. und Ruoslahti, E. (1997): Integrins and anoikis, *Current Opinion in Cell Biology* (Band 9), Nr. 5, Seite 701-6.
- [100] Xu, L. H.; Owens, L. V.; Sturge, G. C.; Yang, X.; Liu, E. T.; Craven, R. J. und Cance, W. G. (1996): Attenuation of the expression of the focal adhesion kinase induces apoptosis in tumor cells, *Cell Growth and Differentiation* (Band 7), Nr. 4, Seite 413-8.
- [101] Ruoslahti, E. (1996): Integrin signaling and matrix assembly, *Tumour Biology* (Band 17), Nr. 2, Seite 117-24.
- [102] Santala, P.; Larjava, H.; Nissinen, L.; Riikonen, T.; Meaeattee, A. und Heino, J. (1994): Suppressed collagen gene expression and induction of alpha 2 beta 1 integrin-type collagen receptor in tumorigenic derivatives of human osteogenic sarcoma HOS cell line, *Journal of Biological Chemistry* (Band 269), Nr. 2, Seite 1276-83.
- [103] Chan, B. M.; Matsuura, N.; Takada, Y.; Zetter, B. R. und Hemler, M. E. (1991): In vitro and in vivo consequences of VLA-2 expression on rhabdomyosarcoma cells, *Science* (Band 251), Nr. 5001, Seite 1600-2.
- [104] Zutter, M. M.; Santoro, S. A.; Staatz, W. D. und Tsung, Y. L. (1995): Re-expression of the alpha

- 2 beta 1 integrin abrogates the malignant phenotype of breast carcinoma cells, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (Band 92), Nr. 16, Seite 7411-5.
- [105] Hangan, D.; Uniyal, S.; Morris, V. L.; MacDonald, I. C.; von Ballestrem, C.; Chau, T.; Schmidt, E. E.; Chambers, A. F.; Groom, A. C. und Chan, B. M. (1996): Integrin VLA-2 alpha2beta1 function in postextravasation movement of human rhabdomyosarcoma RD cells in the liver, *Cancer Research* (Band 56), Nr. 13, Seite 3142-9.
- [106] Varner, J. A.; Emerson, D. A. und Juliano, R. L. (1995): Integrin alpha 5 beta 1 expression negatively regulates cell growth: reversal by attachment to fibronectin, *Molecular Biology of the Cell* (Band 6), Nr. 6, Seite 725-40.
- [107] Zhang, Z.; Vuori, K.; Reed, J. C. und Ruoslahti, E. (1995): The alpha 5 beta 1 integrin supports survival of cells on fibronectin and up-regulates Bcl-2 expression, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (Band 92), Nr. 13, Seite 6161-5.
- [108] Vitale, M.; Illario, M.; Di Matola, T.; Casamassima, A.; Fenzi, G. und Rossi, G. (1997): Integrin binding to immobilized collagen and fibronectin stimulates the proliferation of human thyroid cells in culture, *Endocrinology* (Band 138), Nr. 4, Seite 1642-8.
- [109] Strömlad, S.; Becker, J. C.; Yebra, M.; Brooks, P. C. und Cheresh, D. A. (1996): Suppression of p53 activity and p21WAF1/CIP1 expression by vascular cell integrin alphaVbeta3 during angiogenesis, *Journal of Clinical Investigation* (Band 98), Nr. 2, Seite 426-33.
- [110] Varner, J. A.; Brooks, P. C. und Cheresh, D. A. (1995): REVIEW: the integrin alpha V beta 3: angiogenesis and apoptosis, *Cell Adhesion and Communication* (Band 3), Nr. 4, Seite 367-74.
- [111] Vuori, K. und Ruoslahti, E. (1994): Association of insulin receptor substrate-1 with integrins, *Science* (Band 266), Nr. 5190, Seite 1576-8.
- [112] Bartfeld, N. S.; Pasquale, E. B.; Geltosky, J. E. und Languino, L. R. (1993): The alpha v beta 3 integrin associates with a 190-kDa protein that is phosphorylated on tyrosine in response to platelet-derived growth factor, *Journal of Biological Chemistry* (Band 268), Nr. 23, Seite 17270-6.
- [113] Brooks, P. C.; Clark, R. A. und Cheresh, D. A. (1994): Requirement of vascular integrin alpha v beta 3 for angiogenesis, *Science* (Band 264), Nr. 5158, Seite 569-71.
- [114] Strömlad, S. und Cheresh, D. A. (1996): Integrins, angiogenesis and vascular cell survival, *Chemistry and Biology* (Band 3), Nr. 11, Seite 881-5.
- [115] Yashiro, T.; Ohba, Y.; Murakami, H.; Obara, T.; Tsushima, T.; Fujimoto, Y.; Shizume, K. und Ito, K. (1989): Expression of insulin-like growth factor receptors in primary human thyroid neoplasms, *Acta Endocrinologica* (Band 121), Nr. 1, Seite 112-20.
- [116] Vannelli, G. B.; Barni, T.; Modigliani, U.; Paulin, I.; Serio, M.; Maggi, M.; Fiorelli, G. und Balboni, G. C. (1990): Insulin-like growth factor-I receptors in nonfunctioning thyroid nodules, *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* (Band 71), Nr. 5, Seite 1175-82.
- [117] Sekyi-Otu, A.; Bell, R. S.; Ohashi, C.; Pollak, M. und Andrulis, I. L. (1995): Insulin-like growth factor 1 IGF-1 receptors, IGF-1, and IGF-2 are expressed in primary human sarcomas, *Cancer Research* (Band 55), Nr. 1, Seite 129-34.
- [118] Roholl, P. J.; Skottner, A.; Prinsen, I.; Lips, C. J.; Den Otter, W. und Van Unnik, J. A. (1990): Expression of insulin-like growth factor 1 in sarcomas, *Histopathology* (Band 16), Nr. 5, Seite 455-60.
- [119] Ohlsson, C.; Kley, N.; Werner, H. und LeRoith, D. (1998): p53 regulates insulin-like growth factor-I IGF-I receptor expression and IGF-I-induced tyrosine phosphorylation in an osteosarcoma cell line: interaction between p53 and Sp1, *Endocrinology* (Band 139), Nr. 3, Seite 1101-7.
- [120] Jones, J. I.; Doerr, M. E. und Clemmons, D. R. (1995): Cell migration: interactions among integrins, IGFs and IGFBPs, *Progress in Growth Factor Research* (Band 6), Nr. 2-4, Seite 319-27.
- [121] Doerr, M. E. und Jones, J. I. (1996): The roles of integrins and extracellular matrix proteins in the insulin-like growth factor I-stimulated chemotaxis of human breast cancer cells, *Journal of Biological Chemistry* (Band 271), Nr. 5, Seite 2443-7.

- [122] Hölting, T.; Siperstein, A. E.; Clark, O. H. und Duh, Q. Y. (1994): Epidermal growth factor enhances proliferation, migration, and invasion of follicular and papillary thyroid cancer in vitro and in vivo, *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* (Band 79), Nr. 2, Seite 401-8.
- [123] Lemoine, N. R.; Hughes, C. M.; Gullick, W. J.; Brown, C. L. und Wynford-Thomas, D. (1991): Abnormalities of the EGF receptor system in human thyroid neoplasia, *International Journal of Cancer* (Band 49), Nr. 4, Seite 558-61.
- [124] Haugen, D. R.; Akslen, L. A.; Varhaug, J. E. und Lillehaug, J. R. (1993): Demonstration of a TGF- α -EGF-receptor autocrine loop and c-myc protein over-expression in papillary thyroid carcinomas, *International Journal of Cancer* (Band 55), Nr. 1, Seite 37-43.
- [125] van der Laan, B. F.; Freeman, J. L. und Asa, S. L. (1995): Expression of growth factors and growth factor receptors in normal and tumorous human thyroid tissues, *Thyroid* (Band 5), Nr. 1, Seite 67-73.
- [126] Duh, Q. Y.; Gum, E. T.; Gerend, P. L.; Raper, S. E. und Clark, O. H. (1985): Epidermal growth factor receptors in normal and neoplastic thyroid tissue, *Surgery* (Band 98), Nr. 6, Seite 1000-7.
- [127] Akslen, L. A. (1993): Prognostic importance of histologic grading in papillary thyroid carcinoma, *Cancer* (Band 72), Nr. 9, Seite 2680-5.
- [128] Akslen, L. A. und Varhaug, J. E. (1995): Oncoproteins and tumor progression in papillary thyroid carcinoma: presence of epidermal growth factor receptor, c-erbB-2 protein, estrogen receptor related protein, p21-ras protein, and proliferation indicators in relation to tumor recurrences and patient survival, *Cancer* (Band 76), Nr. 9, Seite 1643-54.
- [129] Bauknecht, T.; Runge, M.; Schwall, M. und Pfeleiderer, A. (1988): Occurrence of epidermal growth factor receptors in human adnexal tumors and their prognostic value in advanced ovarian carcinomas, *Gynecologic Oncology* (Band 29), Nr. 2, Seite 147-57.
- [130] Bauknecht, T.; Janz, I.; Kohler, M. und Pfeleiderer, A. (1989): Human ovarian carcinomas: correlation of malignancy and survival with the expression of epidermal growth factor receptors EGF-R and EGF-like factors EGF-F, *Medical Oncology and Tumor Pharmacotherapy* (Band 6), Nr. 2, Seite 121-7.
- [131] Bauknecht, T.; Kiechle, M.; Bauer, G. und Siebers, J. W. (1986): Characterization of growth factors in human ovarian carcinomas, *Cancer Research* (Band 46), Nr. 5, Seite 2614-8.
- [132] Bauknecht, T.; Kommoss, F.; Birmelin, G.; von Kleist, S.; Kohler, M. und Pfeleiderer, A. (1991): Expression analysis of EGF-R and TGF α in human ovarian carcinomas, *Anticancer Research* (Band 11), Nr. 4, Seite 1523-8.
- [133] Foekens, J. A.; van Putten, W. L.; Portengen, H.; Rodenburg, C. J.; Reubi, J. C.; Berns, P. M.; Henzen-Logmans, S. C.; van der Burg, M. E.; Alexieva-Figusch, J. und Klijn, J. G. (1990): Prognostic value of pS2 protein and receptors for epidermal growth factor EGF-R, insulin-like growth factor-1 IGF-1-R and somatostatin SS-R in patients with breast and ovarian cancer, *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* (Band 37), Nr. 6, Seite 815-21.
- [134] Henzen-Logmans, S. C.; van der Burg, M. E.; Foekens, J. A.; Berns, P. M.; Brussaee, R.; Fieret, J. H.; Klijn, J. G.; Chadha, S. und Rodenburg, C. J. (1992): Occurrence of epidermal growth factor receptors in benign and malignant ovarian tumors and normal ovarian tissues: an immunohistochemical study, *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* (Band 118), Nr. 4, Seite 303-7.
- [135] van der Burg, M. E.; Henzen-Logmans, S. C.; Foekens, J. A.; Berns, E. M.; Rodenburg, C. J.; van Putten, W. L. und Klijn, J. G. (1993): The prognostic value of epidermal growth factor receptors, determined by both immunohistochemistry and ligand binding assays, in primary epithelial ovarian cancer: a pilot study, *European Journal of Cancer* (Band 29A), Nr. 14, Seite 1951-7.
- [136] Gusterson, B.; Cowley, G.; McIlhinney, J.; Ozanne, B.; Fisher, C. und Reeves, B. (1985): Evidence for increased epidermal growth factor receptors in human sarcomas, *International Journal of Cancer* (Band 36), Nr. 6, Seite 689-93.
- [137] Perosio, P. M. und Brooks, J. J. (1989): Expression of growth factors and growth factor

- receptors in soft tissue tumors. Implications for the autocrine hypothesis, *Lab Invest* (Band 60), Nr. 2, Seite 245-53.
- [138] Duda, R. B.; Cundiff, D.; August, C. Z.; Wagman, L. D. und Bauer, K. D. (1993): Growth factor receptor and related oncogene determination in mesenchymal tumors, *Cancer* (Band 71), Nr. 11, Seite 3526-30.
- [139] Soares, P.; Sambade, C. und Sobrinho-Simoes, M. (1994): Expression of C-erb B2 in tumours and tumour-like lesions of the thyroid [letter], *International Journal of Cancer* (Band 56), Nr. 3, Seite 459-61.
- [140] Haugen, D. R.; Akslen, L. A.; Varhaug, J. E. und Lillehaug, J. R. (1992): Expression of c-erbB-2 protein in papillary thyroid carcinomas, *British Journal of Cancer* (Band 65), Nr. 6, Seite 832-7.
- [141] Zhang, X.; Silva, E.; Gershenson, D. und Hung, M. C. (1989): Amplification and rearrangement of c-erb B proto-oncogenes in cancer of human female genital tract, *Oncogene* (Band 4), Nr. 8, Seite 985-9.
- [142] Bauknecht, T.; Birmelin, G. und Kommoss, F. (1990): Clinical significance of oncogenes and growth factors in ovarian carcinomas, *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* (Band 37), Nr. 6, Seite 855-62.
- [143] Berchuck, A.; Kamel, A.; Whitaker, R.; Kerns, B.; Olt, G.; Kinney, R.; Soper, J. T.; Dodge, R.; Clarke-Pearson, D. L.; Marks, P. und et al. (1990): Overexpression of HER-2/neu is associated with poor survival in advanced epithelial ovarian cancer, *Cancer Research* (Band 50), Nr. 13, Seite 4087-91.
- [144] Slamon, D. J.; Godolphin, W.; Jones, L. A.; Holt, J. A.; Wong, S. G.; Keith, D. E.; Levin, W. J.; Stuart, S. G.; Udove, J.; Ullrich, A. und et al. (1989): Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer, *Science* (Band 244), Nr. 4905, Seite 707-12.
- [145] Berns, E. M.; Klijn, J. G.; Henzen-Logmans, S. C.; Rodenburg, C. J.; van der Burg, M. E. und Foekens, J. A. (1992): Receptors for hormones and growth factors and onco -gene amplification in human ovarian cancer, *International Journal of Cancer* (Band 52), Nr. 2, Seite 218-24.
- [146] Kraimps, J. L.; Maetayae, T.; Millet, C.; Margerit, D.; Ingrand, P.; Goujon, J. M.; Levillain, P.; Babin, P.; Begon, F. und Barbier, J. (1995): Cathepsin D in normal and neoplastic thyroid tissues, *Surgery* (Band 118), Nr. 6, Seite 1036-40.
- [147] Dunn, A. D.; Crutchfield, H. E. und Dunn, J. T. (1991): Thyroglobulin processing by thyroidal proteases. Major sites of cleavage by cathepsins B, D, and L, *Journal of Biological Chemistry* (Band 266), Nr. 30, Seite 20198-204.
- [148] Scambia, G.; Ranelletti, F. O.; Panici, P. B.; De Vincenzo, R.; Bonanno, G.; Ferrandina, G.; Piantelli, M.; Bussa, S.; Rumi, C.; Cianfriglia, M. und et al. (1994): Quercetin potentiates the effect of adriamycin in a multidrug-resistant MCF-7 human breast-cancer cell line: P-glycoprotein as a possible target [see comments], *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* (Band 34), Nr. 6, Seite 459-64.
- [149] Torney, D. C.; Dembo, M. und Bell, G. I. (1986): Thermodynamics of cell adhesion. II. Freely mobile repellers, *Biophys J* (Band 49), Nr. 2, Seite 501-7. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=0003955182>
- [150] Sherbet, G. V.; Lakshimi, M. S. und Rao, K. V. (1972): Characterisation of ionogenic groups and estimation of the net negative electric charge on the surface of cells using natural pH gradients, *Exp Cell Res* (Band 70), Nr. 1, Seite 113-23. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=0004109349>
- [151] Parsegian, V. A. (1973): Long-range physical forces in the biological milieu, *Annu Rev Biophys Bioeng* (Band 2), Seite 221-55. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=0004583655>
- [152] Marshall, J. F.; Perry, P.; Stone, M. und Hart, I. R. (1996): The alpha-v integrin subunit blocking antibody 17E6 induced spheroid formation in carcinoma cell lines expressing functional E-cadherin, *Clinical & Experimental Metastasis* (Band 14 Suppl 1), Seite 53 - P.03.10.

- [153] Rak, J.; Mitsuhashi, Y.; Erdos, V.; Huang, S. N.; Filmus, J. und Kerbel, R. S. (1995): Massive programmed cell death in intestinal epithelial cells induced by three-dimensional growth conditions: suppression by mutant c-H-ras oncogene expression, *Journal of Cell Biology* (Band 131), Nr. 6 Pt 1, Seite 1587-98.

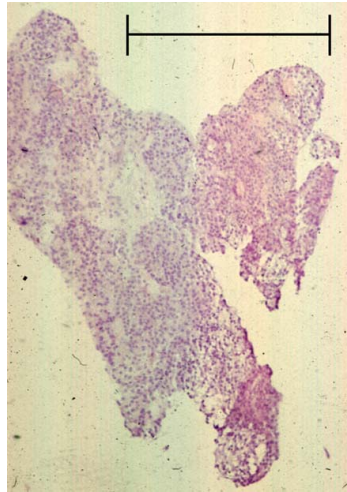
Anhang

Zur Verdeutlichung der immunhistologischen Ergebnisse sind auf den folgenden Seiten Abdrucke von Fotografien der gezüchteten Zellaggregate beigelegt.

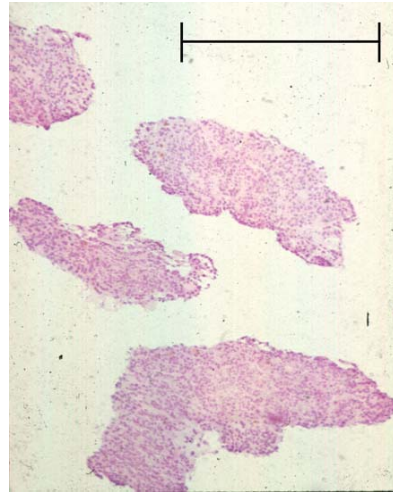
Die Fotografien wurden mit einer Nikon Kamera direkt vom Mikroskop aufgenommen und als Diafilm entwickelt. Anschließend wurden die Fotos mit einem Diascanner digitalisiert. Die digitale Bildbearbeitung erfolgte mit äußerster Zurückhaltung, nur offensichtliche Artefakte, wie zum Beispiel Blaustich und Weißpunktabweichung, wurden korrigiert.

Schließlich wurden die Fotografien mit einem handelsüblichen Farbdrucker (Hewlett-Packard 970Cse) auf Normalpapier ausgedruckt. Die dabei resultierende Bildqualität läßt keine immunhistologische Beurteilung zu. Die folgenden Seiten sind ein Versuch, die immunhistochemischen Resultate der Arbeit dem Leser näherzubringen

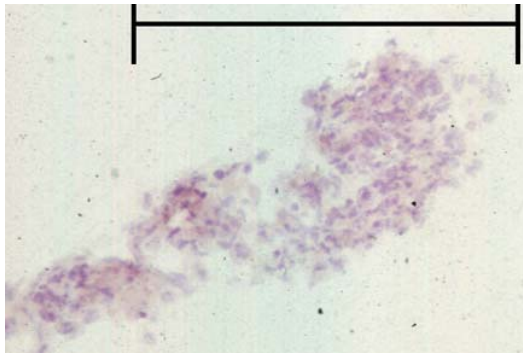
HE Färbung



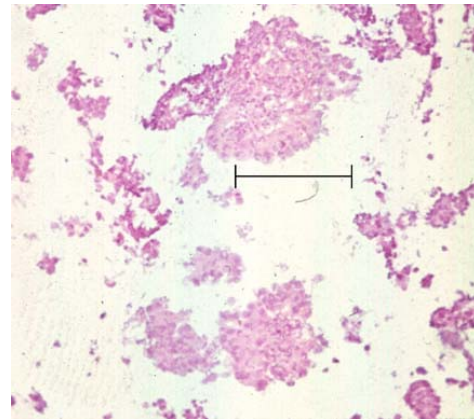
Schilddrüsenengewebe



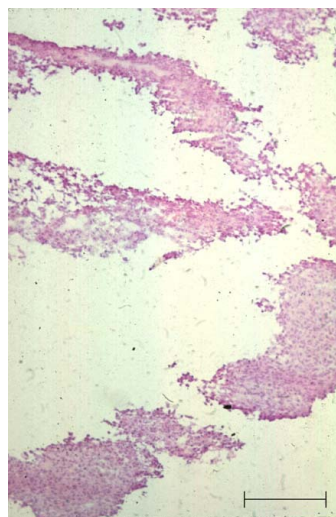
Schilddrüsenadenom



Schilddrüsenkarzinom

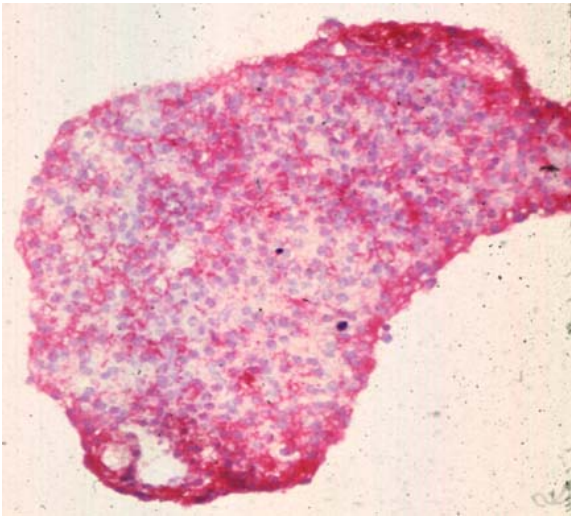


Ovarialkarzinom

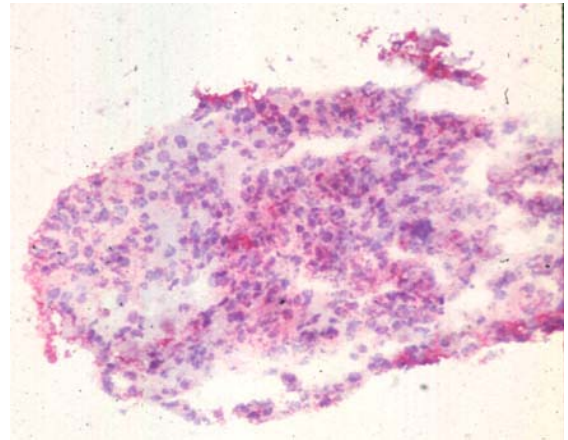


Sarkom

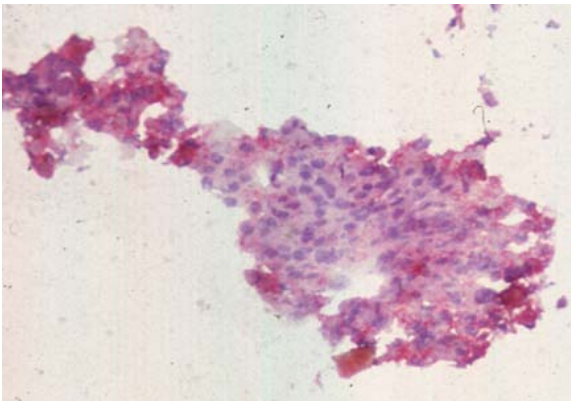
HEA



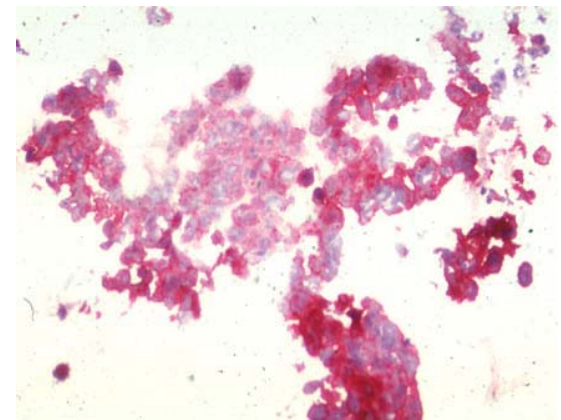
Schilddrüsen Gewebe



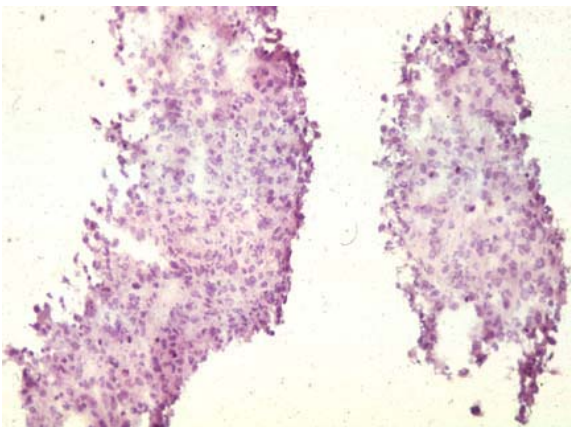
Schilddrüsenadenom



Schilddrüsenkarzinom

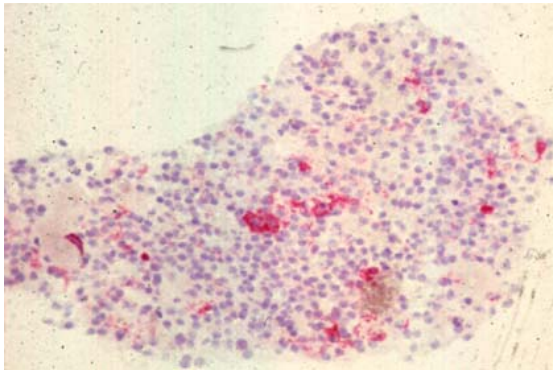


Ovarialkarzinom

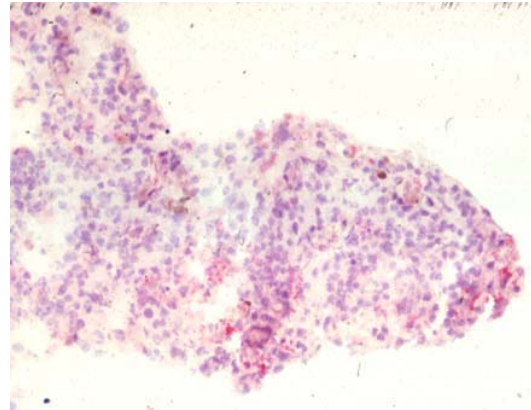


Sarkom

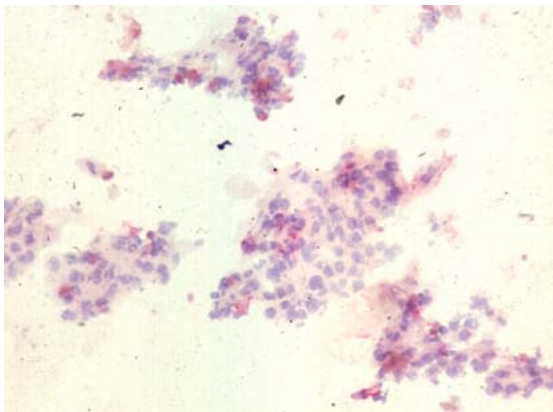
CD 31



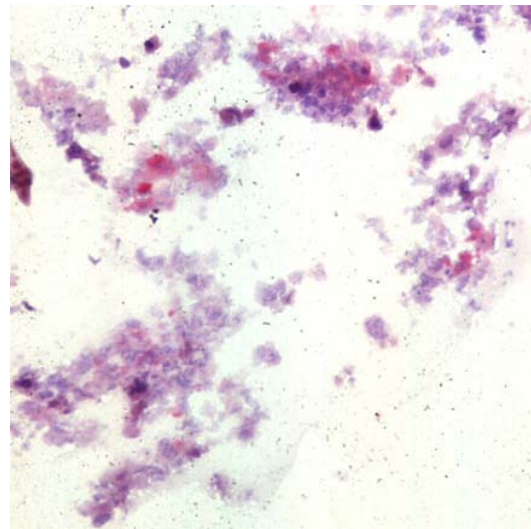
Schilddrüsengewebe



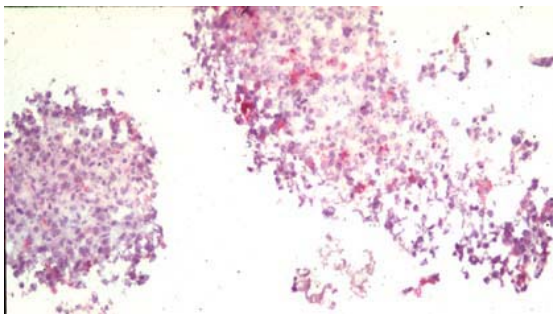
Schilddrüsenadenom



Schilddrüsenkarzinom

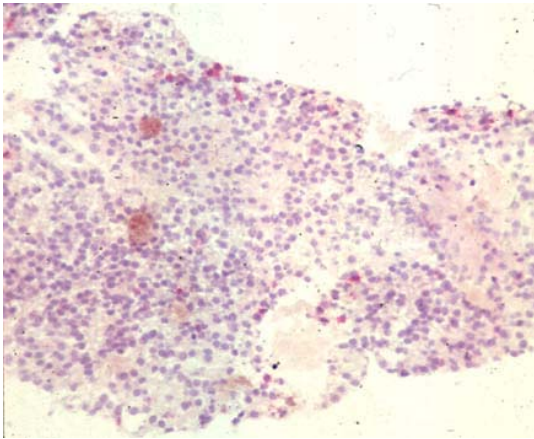


Ovarialkarzinom

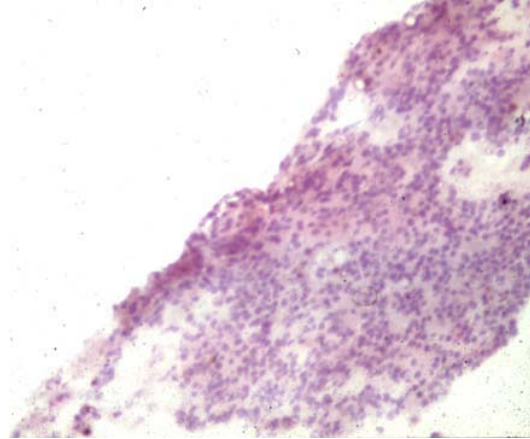


Sarkom

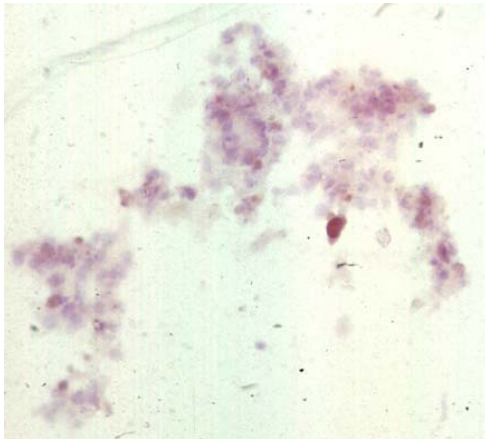
CD 45



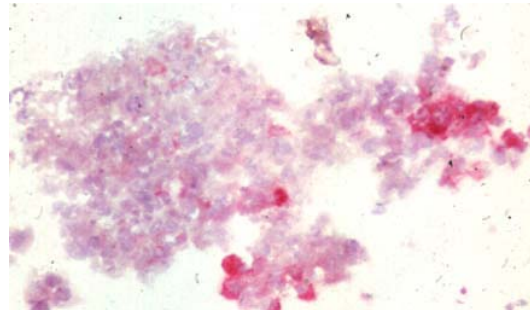
Schilddrüsengewebe



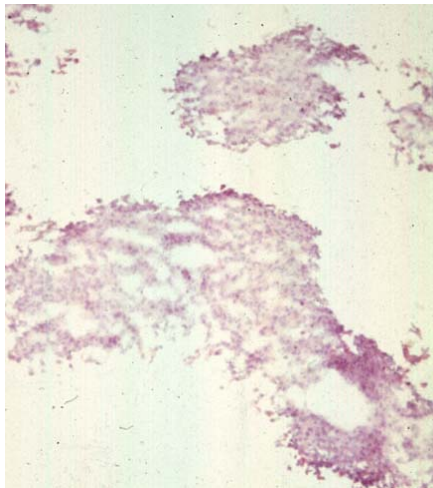
Schilddrüsenadenom



Schilddrüsenkarzinom

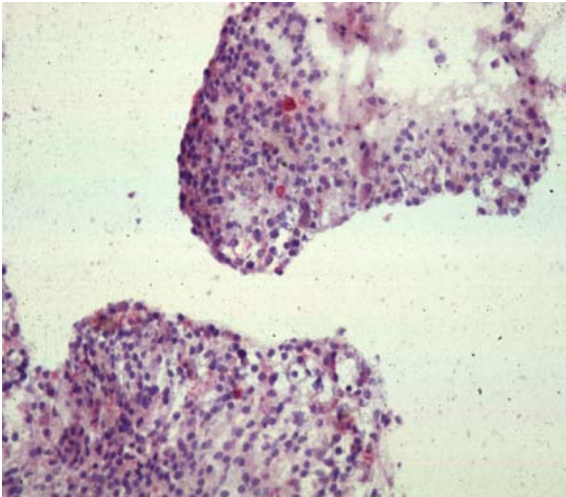


Ovarialkarzinom

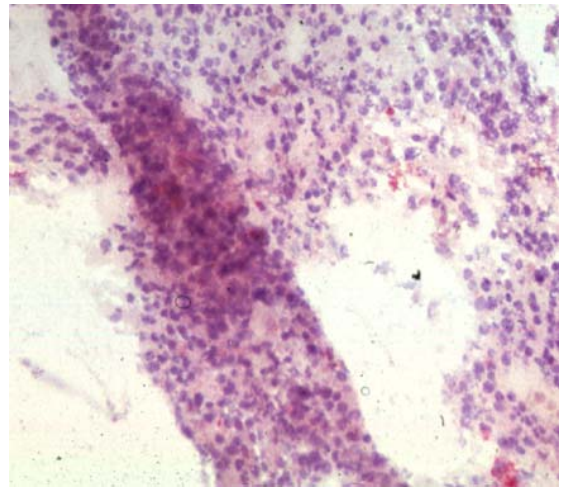


Sarkom

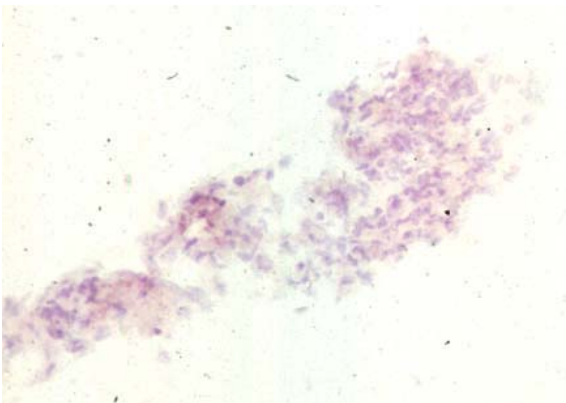
CD 68



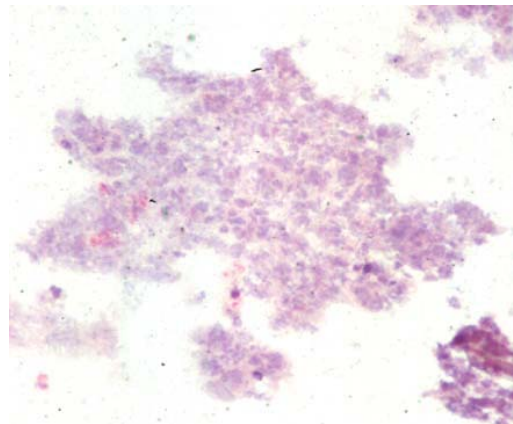
Schilddrüsengewebe



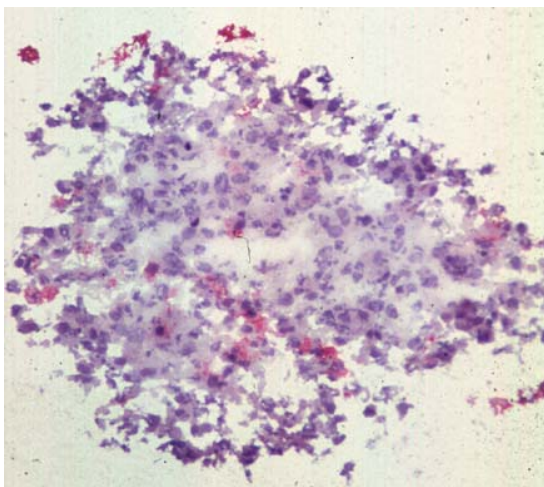
Schilddrüsenadenom



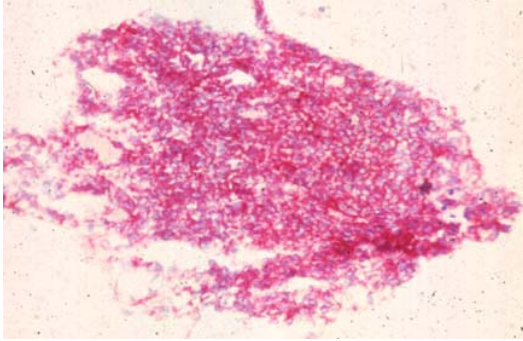
Schilddrüsenkarzinom



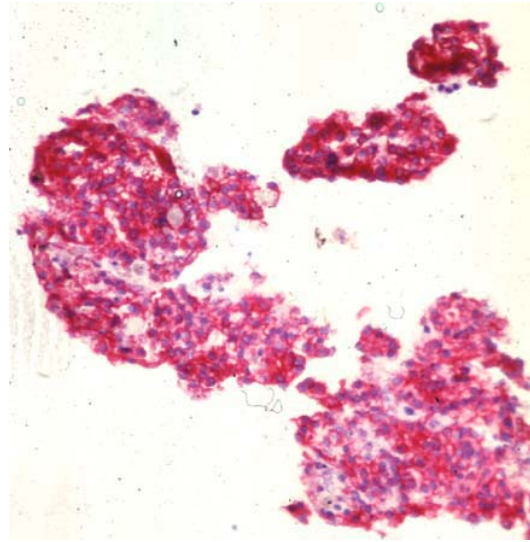
Ovarialkarzinom



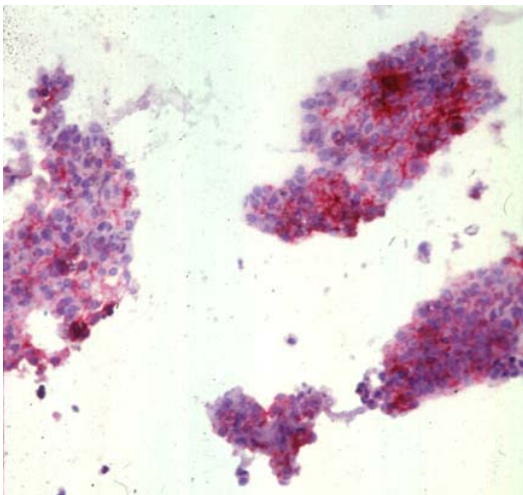
Sarkom

E-Cadherin

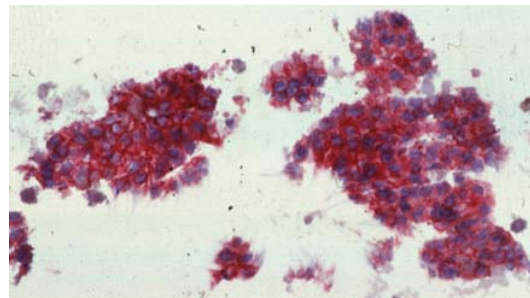
Schilddrüsengewebe



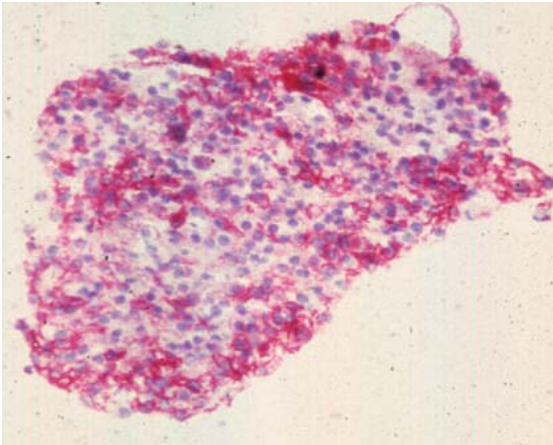
Schilddrüsenadenom



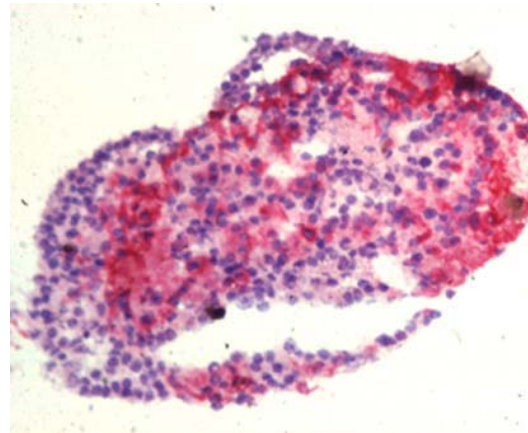
Schilddrüsenkarzinom



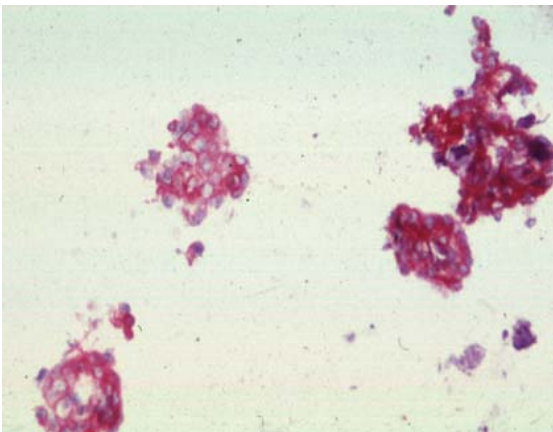
Ovarialkarzinom

Alpha 2 Integrin

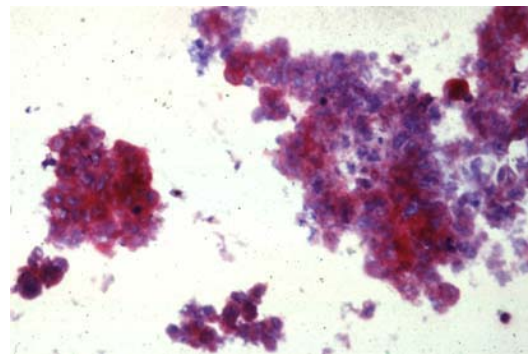
Schilddrüsenengewebe



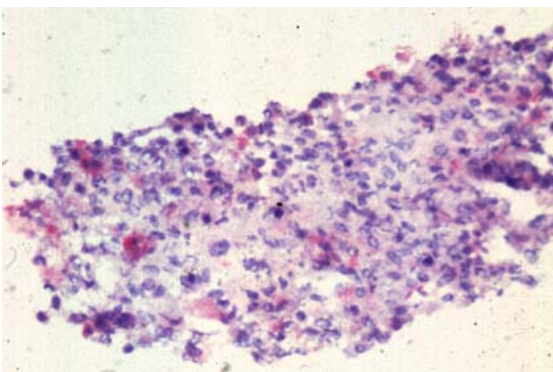
Schilddrüsenadenom



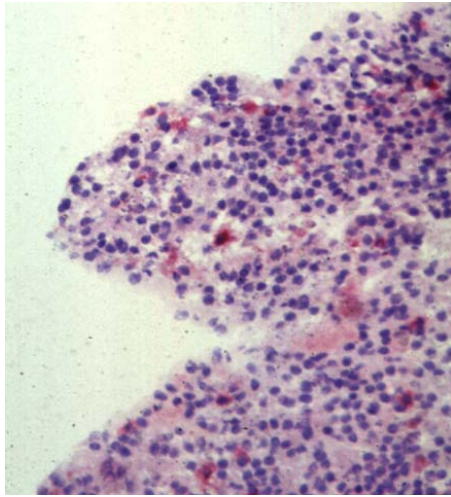
Schilddrüsenkarzinom



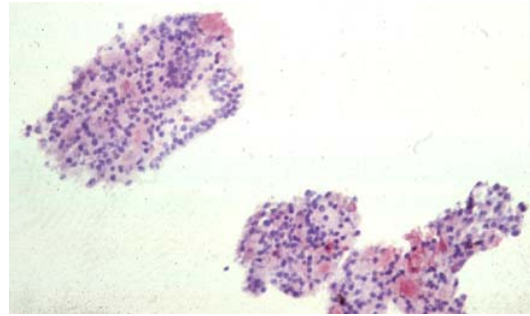
Ovarialkarzinom



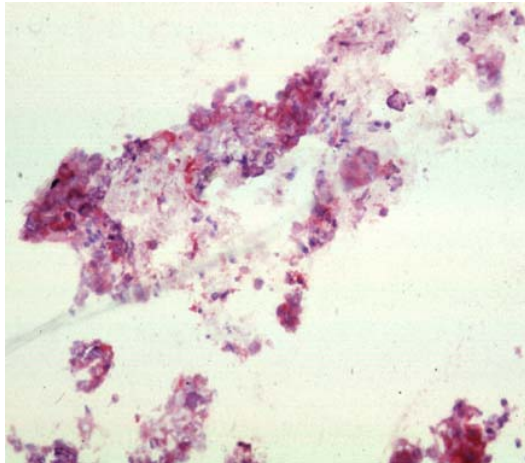
Sarkom

Alpha 4 Integrin

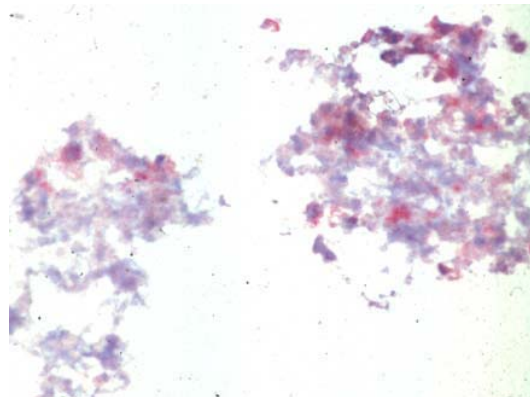
Schilddrüsenengewebe



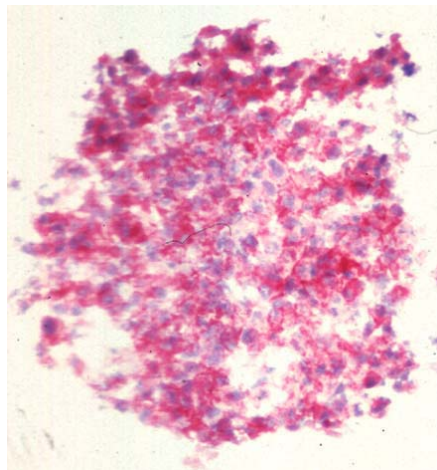
Schilddrüsenadenom



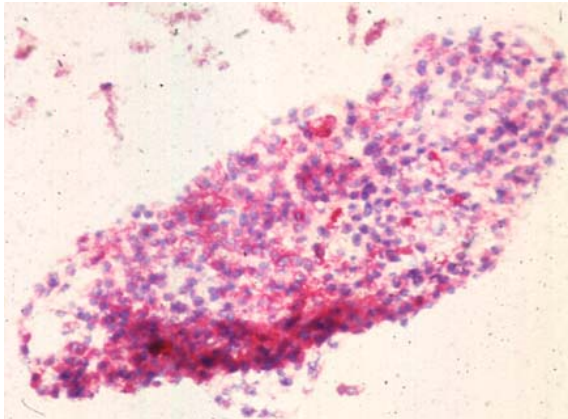
Schilddrüsenkarzinom



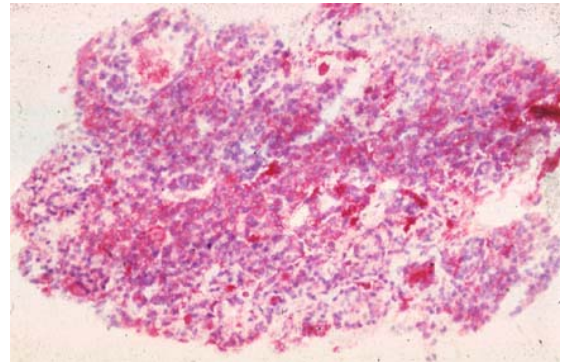
Ovarialkarzinom



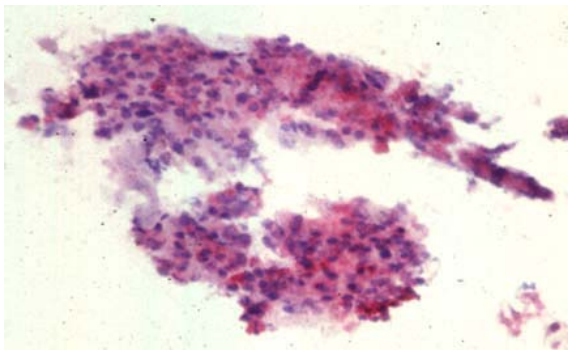
Sarkom

Alpha 5 Integrin

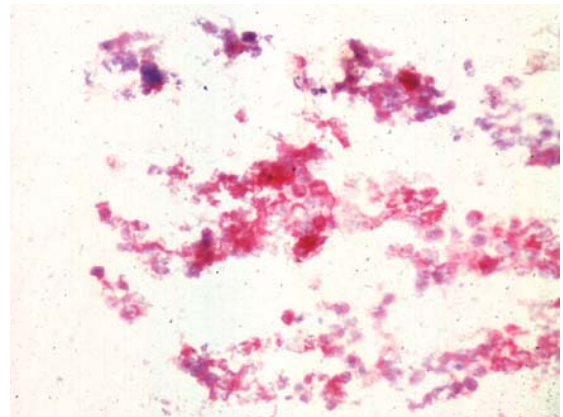
Schilddrüsengewebe



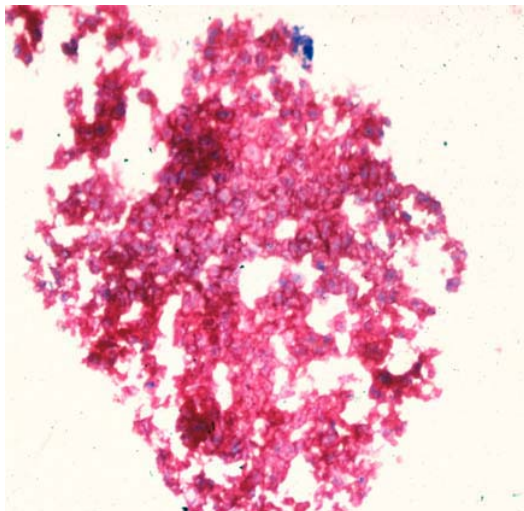
Schilddrüsenadenom



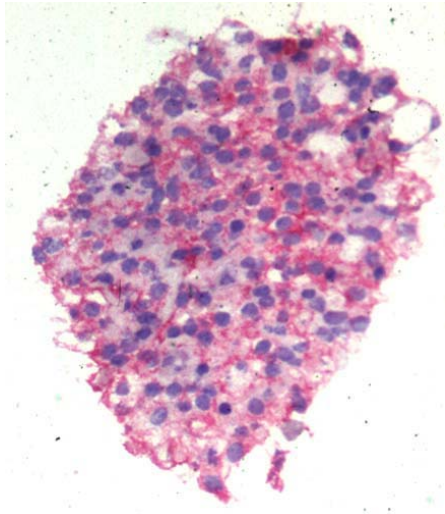
Schilddrüsenkarzinom



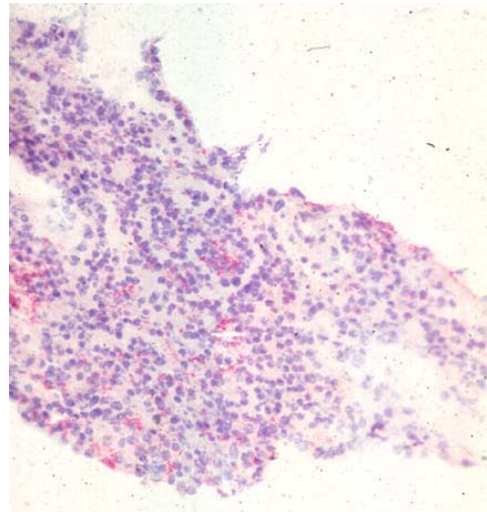
Ovarialkarzinom



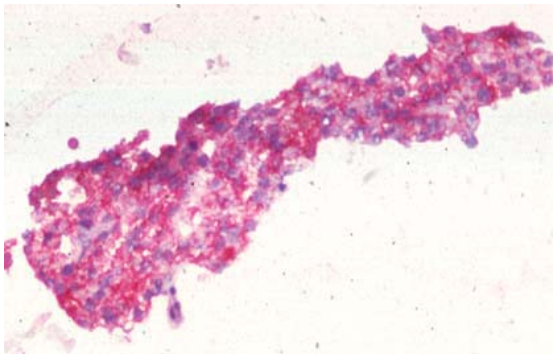
Sarkom

Alpha V Integrin

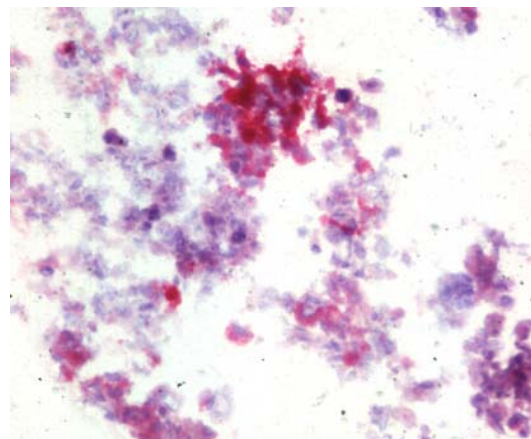
Schilddrüsengewebe



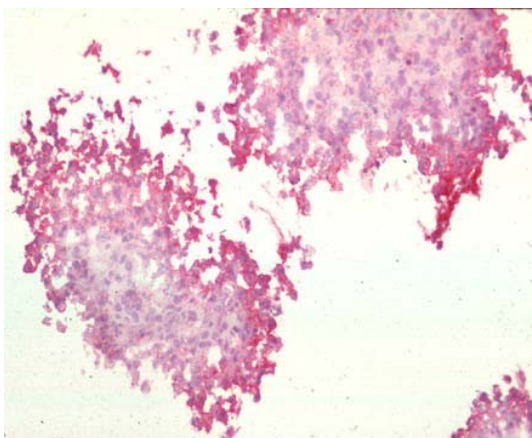
Schilddrüsenadenom



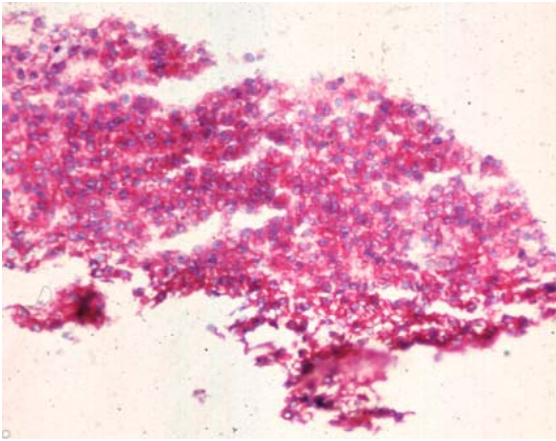
Schilddrüsenkarzinom



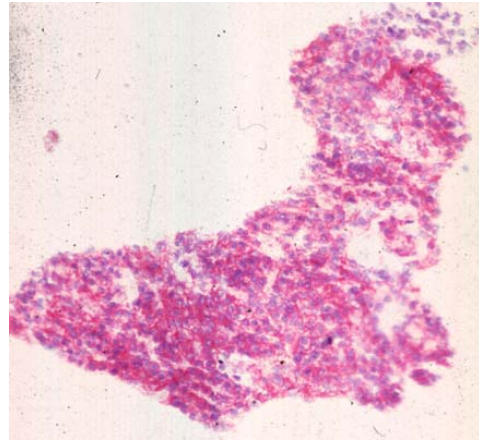
Ovarialkarzinom



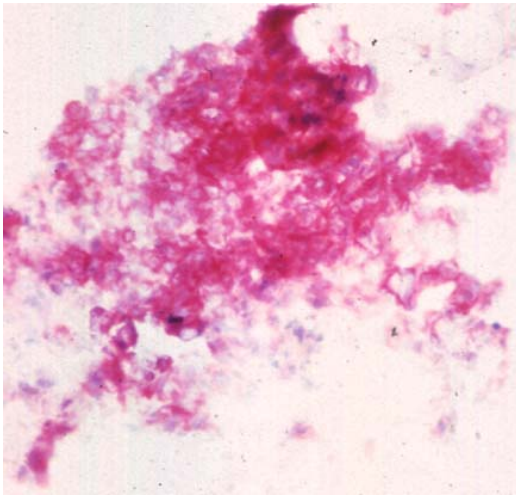
Sarkom

IGF-I-Rezeptor

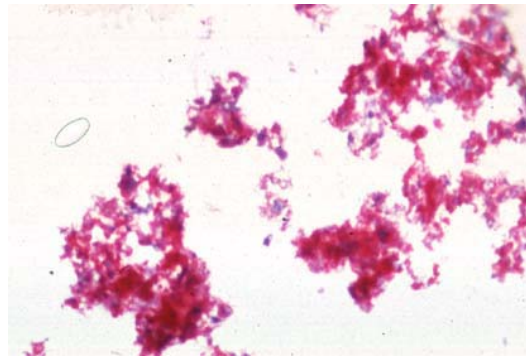
Schilddrüsengewebe



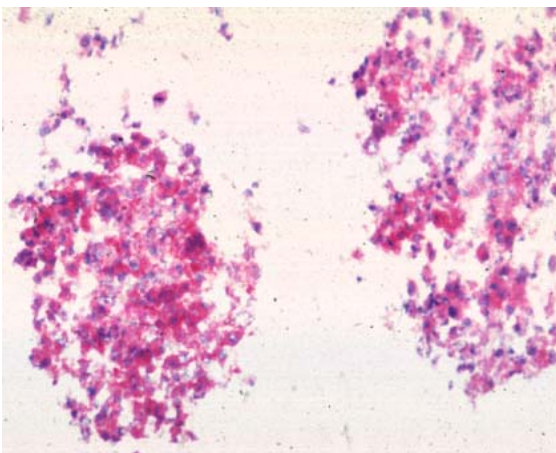
Schilddrüsenadenom



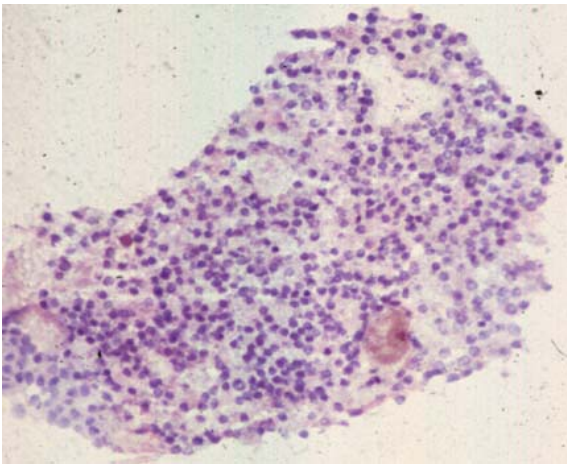
Schilddrüsenkarzinom



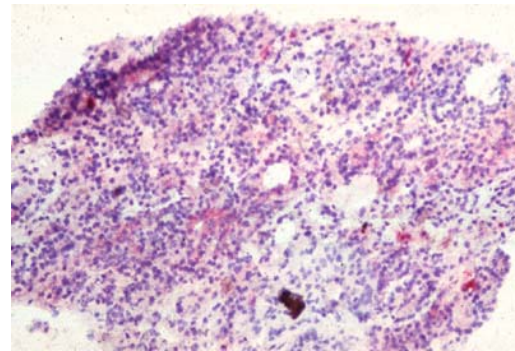
Ovarialkarzinom



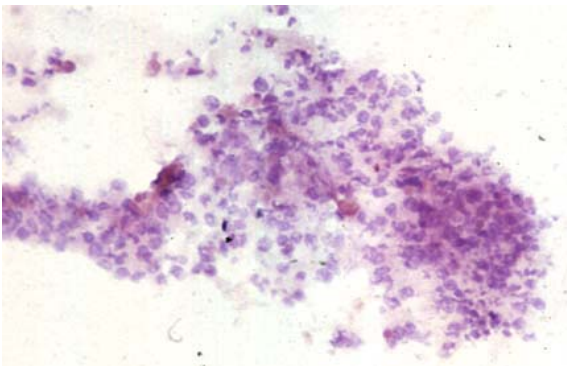
Sarkom

EGF Rezeptor

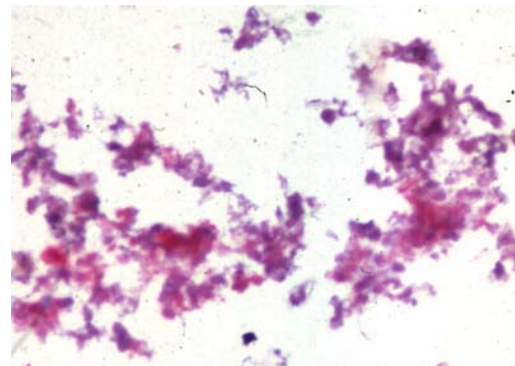
Schilddrüsengewebe



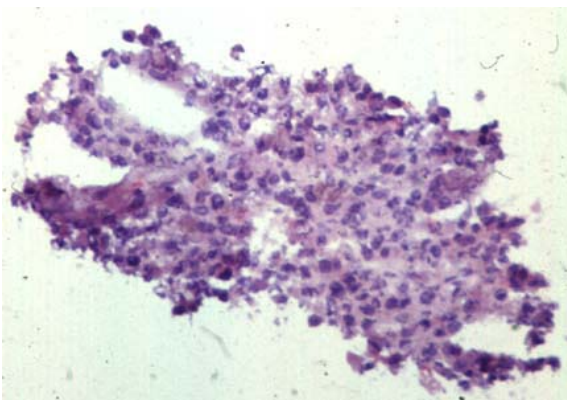
Schilddrüsenadenom



Schilddrüsenkarzinom

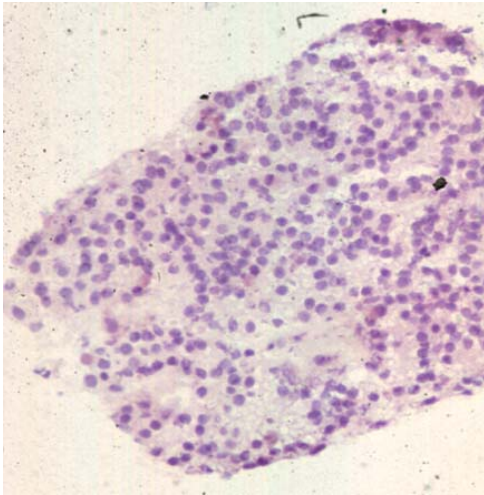


Ovarialkarzinom

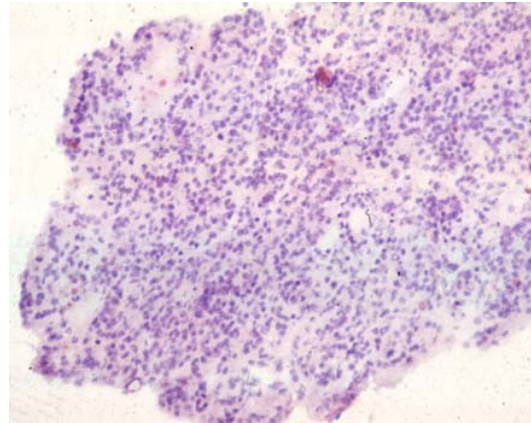


Sarkom

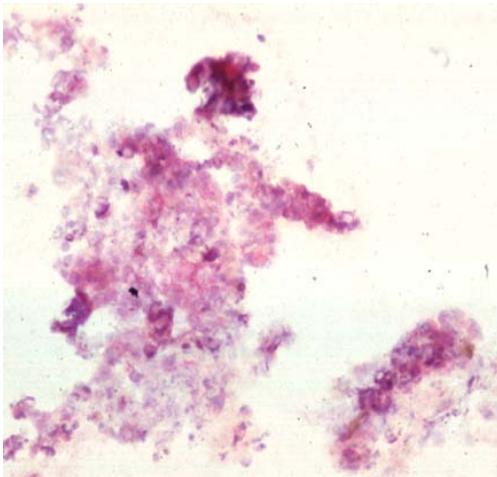
c-erbB 2



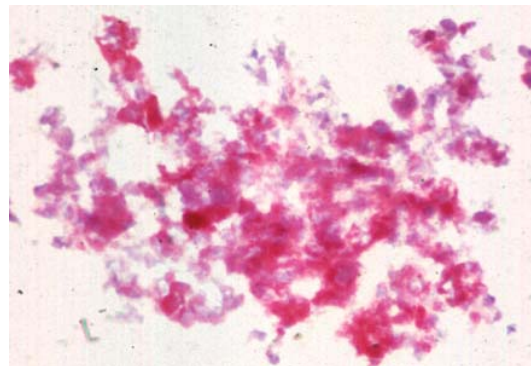
Schilddrüsengewebe



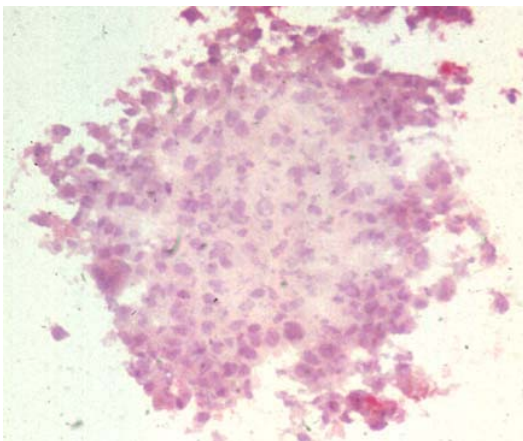
Schilddrüsenadenom



Schilddrüsenkarzinom

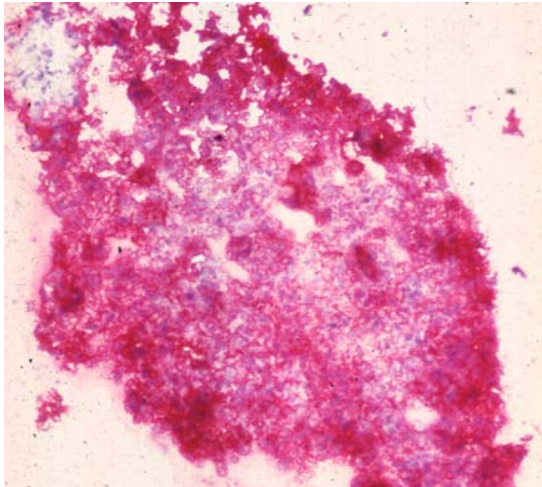


Ovarialkarzinom

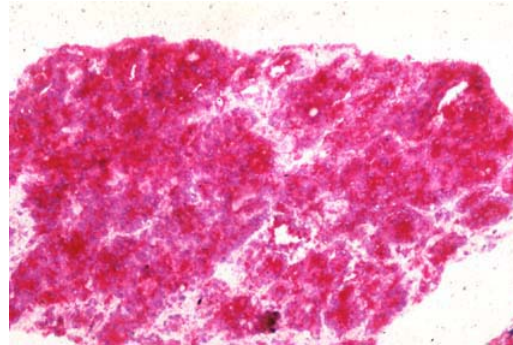


Sarkom

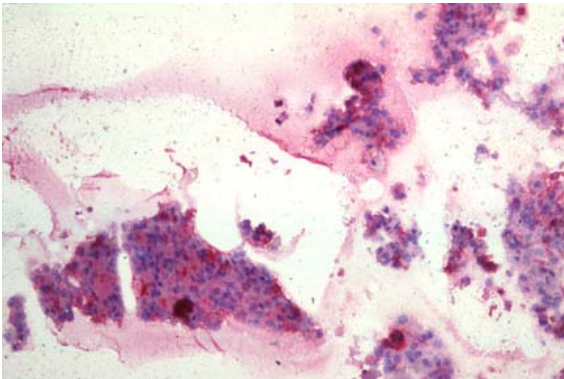
Cathepsin D



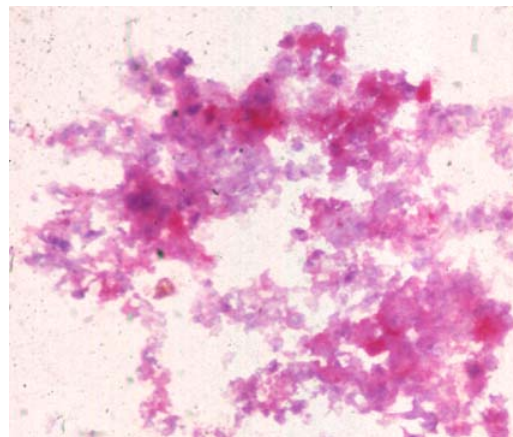
Schilddrüsengewebe



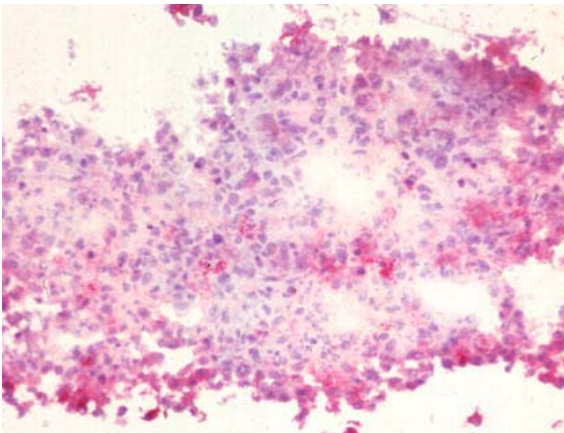
Schilddrüsenadenom



Schilddrüsenkarzinom



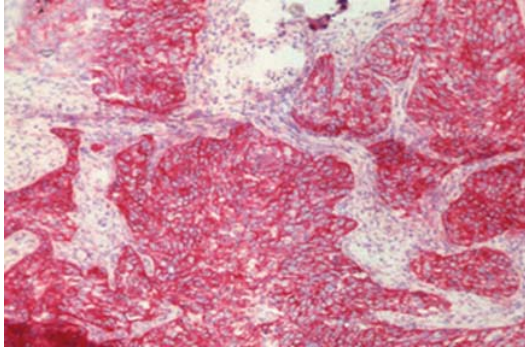
Ovarialkarzinom



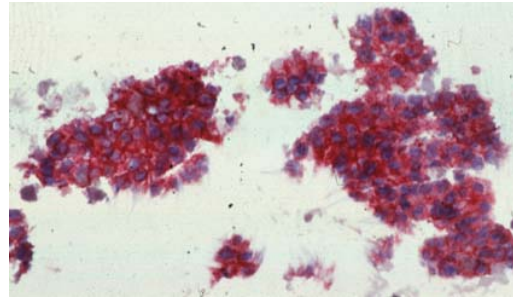
Sarkom

Vergleich Primärzellenaggregat - Herkunftsgewebe

E-Cadherin

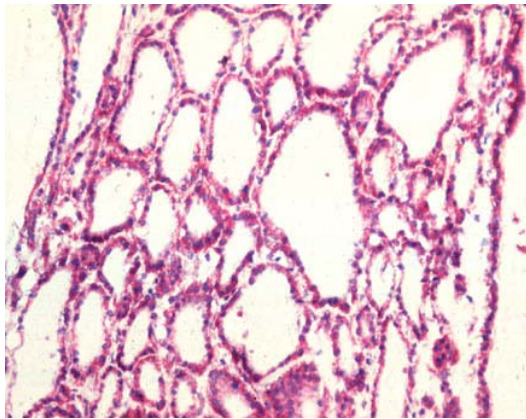


Ovarialkarzinom Herkunftsgewebe

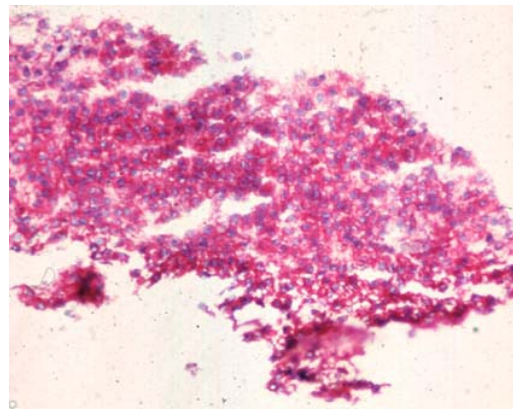


Ovarialkarzinom Aggregat

IGF-I-Rezeptor



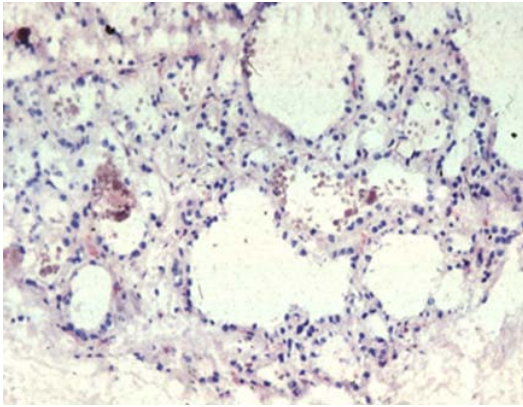
Schilddrüsengewebe Herkunftsgewebe



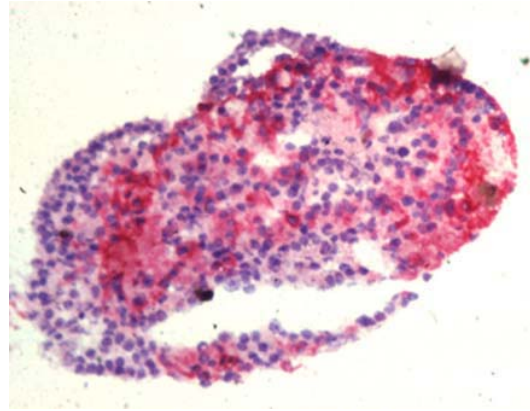
Schilddrüsengewebe Aggregat

Vergleich Primärzellenaggregat - Herkunftsgewebe

Alpha 2 Integrin

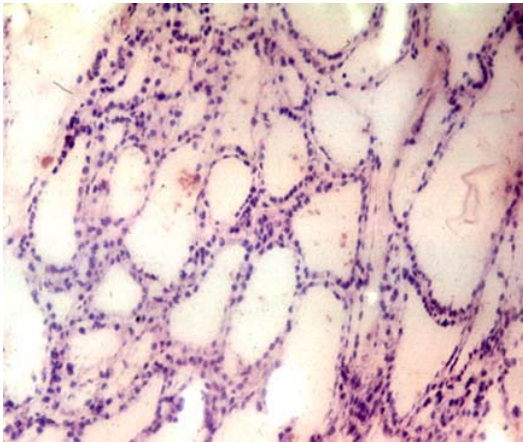


Schilddrüsenadenom Herkunftsgewebe

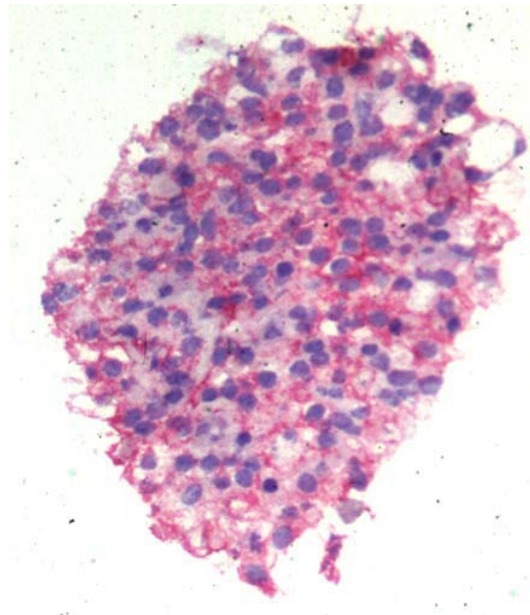


Schilddrüsenadenom Aggregat

Alpha V Integrin



Schilddrüsenengewebe Herkunftsgewebe



Schilddrüsenengewebe Aggregat

Präsentationen

1. **String A.**, Liebrich W., Haensch W., Schlag P. M., Hohenberger P., "Immunhistochemische Vergleichsanalyse von Spheroïden und Ursprungsgeweben zur Charakterisierung der in-vitro Anpassung", 114. Chirurgenkongreß, April 1997, München
2. **String A.**, Liebrich W., Haensch W., Hohenberger P. "Upregulation of Integrins - a tool to adapt to altered cellular surroundings?", 7th European Medical Student Conference, Oktober 1996, Berlin
3. **String A.**, Berber E., Engle K., Siperstein A.S., "Laparoskopische thermische Ablation primärer und sekundärer Lebertumoren – eine neue, sichere und schonende Behandlungsmethode fortgeschrittener Lebertumoren", 116. Chirurgenkongreß, April 1999, München.
4. **String A.**, Berber E., Foroutani A., Siperstein A., "The use of the optical access trocar for safe and rapid entry in various laparoscopic procedures", SAGES 2000, April 2000, Atlanta, GA, USA
5. Siperstein A., Berber E., Engle K., Garland A., Rogers S., Ryan T., **String A.**, Ituarte P., "Local recurrence after laparoscopic radiofrequency thermal ablation of hepatic tumors", The Society of Surgical Oncology's 52nd Annual Cancer Symposium, März 1999, Orlando, FL, USA.
6. Berber E., Engle K., Pearl J.M., **String A.**, Siperstein A.E., "A critical analysis of intraoperative time utilization in laparoscopic cholecystectomy" SAGES, März 1999, San Antonio, TX, USA
7. Berber E., Kim K.M., Engle L.E., **String A.**, Ituarte P., Siperstein A.E., "Intraoperative thermal regulation in patients undergoing laparoscopic versus open surgical procedures", SAGES, März 1999, San Antonio, TX, USA
8. Siperstein AE, Garland A, Engle LE, Rogers SJ, Berber E, **String A.**, Foroutani A, Ryan T. Laparoscopic radiofrequency ablation of primary and metastatic liver tumors: technical considerations. SAGES, März 1999, San Antonio, TX., USA
9. Berber E, **String A.**, Engle KL, Chang G, Macho JR, Pearl JM, Siperstein AE. Selective use of tube cholecystostomy with interval laparoscopic cholecystectomy in acute cholecystitis. Pacific Coast Surgical Association, 70th Annual Meeting, Februar 1998, San Jose del Cabo, B.C.S. Mexico.

Publikationen

1. **String A.**, Liebrich W., Haensch W., Schlag P. M., Hohenberger P., "Immunhistochemische Vergleichsanalyse von Spheroïden und Ursprungsgeweben zur Charakterisierung der in-vitro Anpassung", Langenbecks Archiv für Chirurgie. Supplement 1997, 114:69-73
2. **String A.**, Berber E., Engle K., Siperstein A.S., "Laparoskopische thermische Ablation primärer und sekundärer Lebertumoren – eine neue, sichere und schonende Behandlungsmethode fortgeschrittener Lebertumoren", Deutsche Gesellschaft für Chirurgie Kongreßband 1999, 1282-85
3. Siperstein A., Garland A., Engle K.L., Rogers S., Berber E., Foroutani A., **String A.**, Ryan T., Local recurrence after laparoscopic radiofrequency thermal ablation of hepatic tumors. Annals of Surgical Oncology 2000 Mar;7(2):106-13
4. Siperstein A.E., Garland A., Engle K.L., Rogers S.J., Berber E., **String A.**, Foroutani A., Ryan T., "Laparoscopic radiofrequency ablation of primary and metastatic liver tumors: technical considerations" Surg Endosc. 2000 Apr;14(4):400-5.
5. Berber E., **String A.**, Engle K.L., Siperstein A.E., "Laparoscopic management of a posterior mediastinal tumor mimicking an adrenal neoplasm" Surgical Endoscopy (im Druck)
6. Berber E., **String A.**, Engle K.L., Chang G., Macho J.R., Pearl J.M., Siperstein A.E., "Selective use of tube cholecystostomy with interval laparoscopic cholecystectomy in acute cholecystitis", Archives of Surgery 2000 Mar;135(3):341-6.
7. Berber E., Kim K.M., Engle L.E., **String A.**, Ituarte P., Siperstein A.E., "Intraoperative thermal regulation in patients undergoing laparoscopic versus open surgical procedures" Surgical Endoscopy (im Druck)
8. Siperstein A.E., Garland A., Engle L.E., Rogers S.J., Berber E., **String A.**, Foroutani A., Ryan T., "Laparoscopic radiofrequency ablation of primary and metastatic liver tumors: technical considerations" Surgical Endoscopy 2000 Apr;14(4):400-5

9. Foroutani A, Garland AM, Berber E, **String A.**, Engle K, Ryan T, Pearl JM, Siperstein AE. Laparoscopic ultrasound vs triphasic computed tomography for detecting liver tumors. Arch Surg. 2000 Aug;135(8):933-8.